

Molekulare Mechanismen der STAT1-vermittelten Erkennung und Aktivierung von Zielgenen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Verena Koch
aus Rockenberg

Marburg/Lahn 2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer von April 2007 bis Januar 2010 in der Arbeitsgruppe Kardiologie im Biomedizinischen Forschungszentrum in Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 12.03.2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Philipps-Universität Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer (Philipps-Universität Marburg)

Tag der mündlichen Prüfung am: 19.03.2010

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

„Molekulare Mechanismen der STAT1-vermittelten Erkennung und Aktivierung von Zielgenen“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten und angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg / Lahn, den 29.01.2010

gez. Verena Koch

Zusammenfassung

Von allen Mitgliedern der STAT-Familie ist die Signaltransduktion durch den Transkriptionsfaktor STAT1 bislang am besten untersucht, trotzdem sind noch viele Fragen bezüglich des Mechanismus einer effektiven Zielgenaktivierung offen. Insbesondere die molekularen Schritte der Zielgenerkennung, der Rekrutierung von Koaktivatoren und der Regulation der DNA-Bindung sind nur unvollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig STAT1-Mutanten generiert, die eine höhere Affinität zu ihren spezifischen palindromischen DNA-Bindestellen (GAS-Stellen) bzw. eine verbesserte kooperative DNA-Bindung aufweisen. Diese DNA-Bindemutanten wurden als nützliche Werkzeuge zum Studium der Zielgenaktivierung eingesetzt. Durch Mutation zweier Glutaminsäurereste in der DNA-Bindedomäne konnte ein molekularer Mechanismus aufgedeckt werden, wodurch phosphorylierte STAT1-Dimere von DNA dissoziieren und damit transkriptionelle Antworten positiv kontrollieren. Beide Aminosäuren kontaktieren das Phosphodiester-Rückgrat der DNA und fungieren als molekularer Schalter, der sequenzunabhängig gebundene Dimere von DNA freisetzt. Durch Einführen von zwei Punktmutationen lässt sich die Dissoziation von DNA inhibieren, dies wirkt sich in einem vergrößerten Repertoire an möglichen Bindestellen auf DNA und einer verstärkten Bindung an hoch-affinen GAS-Stellen aus. Trotz verbesserter GAS-Bindung und einem erhöhten Level an phosphorylierten STAT1-Dimeren im Zellkern ist die transkriptionelle Aktivität nach IFN γ -Stimulation signifikant reduziert. Diese verminderte Genaktivierung erklärt sich zum einen durch unspezifische DNA-Bindung außerhalb von kanonischen GAS-Stellen, zum anderen durch eine verminderte Austauschreaktion an den Promotoren der Zielgene. Eine hohe Dissoziationsrate von DNA ist daher ein Schlüsselfaktor der STAT1-vermittelten Signaltransduktion, der erklärt, warum hyperphosphorylierte STAT1-Mutanten mit erhaltener GAS-Diskriminierung und erhöhter DNA-Bindeaktivität schlechtere Transkriptionsaktivatoren als das Wildtyp-Protein sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine nukleäre Akkumulation für die Genaktivierung entbehrlich ist. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Mutationen in der N-Domäne identifiziert, die in einer verbesserten kooperativen DNA-Bindung resultierten. Diese zweite Kategorie von DNA-Bindemutanten mit erhaltener GAS-Diskriminierung zeigt eine differentielle Genaktivierung, deren Transkriptionsrate von der Anzahl und Affinität der im Promo-

tor vorhandenen GAS-Stellen abhängt. Mit Hilfe dieser Mutanten konnten erstmalig die Auswirkungen verbesserter Tetramerstabilisierung auf die transkriptionelle Aktivität untersucht werden. Ein erhöhtes Transkriptionsniveau wurde an Genen mit mehreren GAS-Bindestellen beobachtet; die Zielgenaktivierung an einfachen GAS-Stellen durch verbesserte kooperative DNA-Bindung zeigt sich differentiell. Klinische Hinweise darauf, dass solche dysfunktionalen DNA-Bindemutationen von STAT1 krankheitsrelevant sind, konnten in kleineren Stichproben von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (n=235) und verschiedenen Leukämieentitäten (n=25) nicht gefunden werden.

Summary

Signal transduction mediated by STAT1 is the best characterized one in the family of STAT transcription factors. Nevertheless, many questions concerning the mechanism of gene activation by STAT1 remain unanswered. This concludes molecular steps in target gene finding, recruitment of coactivators and regulation of DNA-binding. In this thesis we have generated STAT1-binding mutants, with either higher affinity towards their palindromic GAS sites or preferred cooperative DNA binding, respectively. These DNA-binding mutants were used as valuable tools for studying the activation of IFN γ -sensitive genes. Mutation of two critical glutamyl residues within the DNA-binding domain adjacent to the phosphodiester backbone of DNA identified a molecular mechanism that efficiently releases phospho-STAT1 dimers from DNA and thereby positively controls transcriptional activity. These amino acids act as a molecular off-switch that liberates STAT1 sequence-independently from DNA. A defect in this switch mechanism inhibits the dissociation from DNA, broadens the repertoire of putative binding sites on DNA and also enhances binding to high-affinity GAS sites. Despite elevated levels of tyrosine phosphorylation and a prolonged nuclear accumulation period, the DNA-binding mutants displayed a significantly reduced transcriptional activity upon stimulation of cells with IFN γ . This reduced transcriptional response is explained by the deposition of oligomerized STAT1 molecules outside from GAS sites and a hindered renewal of promoter-bound STAT1 during cytokine stimulation. Thus, a high dissociation rate from DNA is a key feature of STAT1 signal transduction and explains why hyper-phosphorylated STAT1 mutants with conserved GAS recognition and enhanced DNA binding activate target genes less efficiently than the wild-type protein. Additionally, we demonstrate here that nuclear accumulation is dispensable for gene induction. Furthermore, in the course of this work, we identified two mutations located in the N-domain which resulted in an improved cooperative DNA-binding. This second group of DNA binding mutants with conserved GAS recognition exhibited differential gene expression, depending on the number and affinity of GAS sites located in the promoter of target genes. This observation allowed, for the first time, to investigate the impact of preferential cooperative DNA binding on transcriptional activity. We found that gene activation was enhanced for target genes harbouring multiple binding sites, but was indistinguishable from the wild-type molecule on

target genes with only a single discernable GAS site. In human samples from patients with dilated cardiomyopathy (n=235) and leukemia (n=25) we found no clinical evidence suggesting the pathophysiological significance of such DNA-binding mutants.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IV
Summary	VI
Inhaltsverzeichnis	VIII
1 Abkürzungen und Fachbegriffe	1
2 Einleitung	5
3 Material	20
3.1 Chemikalien.....	20
3.2 Puffer, Lösungen und Medien	20
3.3 Radiochemikalien	20
3.4 Antikörper	20
3.5 Enzyme	21
3.6 Reaktionskits	21
3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
3.8 Plasmide.....	22
3.9 Oligonukleotide.....	23
3.10 Bakterienstämme und Medien.....	25
3.11 Eukaryontische Zelllinien.....	26
4 Methoden.....	27
4.1 Zellkultur.....	27
4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	28
4.3 Polymerase-Kettenreaktion	28
4.4 DNA-Gelelektrophorese	29
4.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	30
4.6 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien.....	30
4.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	30
4.8 Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung.....	31
4.9 Einführung von Punktmutationen in Plasmide	31
4.10 DNA-Sequenzierung.....	32

4.11	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	32
4.12	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)	33
4.13	RNA-Isolation	34
4.14	cDNA-Synthese	34
4.15	Real-Time-PCR	34
4.16	Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie.....	35
4.17	Digitonisierung.....	36
4.18	Herstellung von Zellextrakten	36
4.19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
4.20	Western-Blot und immunchemische Proteindetektion	37
4.21	Gelshift-Assays.....	38
4.22	Reporteragen-Assays.....	40
4.23	Dephosphorylierungsassay	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Sequenzhomologien in der DNA-Bindedomäne von STAT-Proteinen.....	42
5.2	Mutationen von zwei Glutaminsäure-Resten in der DNA-Bindedomäne führen zu einer Hyperphosphorylierung von STAT1.....	43
5.3	Tyrosin-phosphoryliertes STAT1-E411A schützt koexprimiertes endogenes STAT1 vor Inaktivierung.....	49
5.4	Die Punktmutanten STAT1-E411A und STAT1-E421K haben eine hohe Affinität zu GAS-Stellen.....	52
5.5	Eine geringe Dissoziationsrate von DNA resultiert in verlängerter Zytokin- induzierter Kernakkumulation.....	55
5.6	Hohe Bindungs-Affinität zu DNA supprimiert die transkriptionelle Aktivität von STAT1	57
5.7	Während der nukleären Akkumulation lagert sich STAT1-E411A an transkriptionell inaktive Bindestellen an.....	62
5.8	Aminoterminaler Punktmutanten als Werkzeuge zum Studium von DNA- Bindung	66
5.9	Zwei Punktmutationen in der N-Domäne resultieren in einer verbesserten kooperativen DNA-Bindung.....	68
5.10	STAT1-D92R und STAT1-E96R zeigen eine normale Kinetik der Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation trotz verbesserter kooperativer DNA- Bindung	72
5.11	Verbesserte kooperative DNA-Bindung von STAT1-D92R und STAT1-E96R führt <i>in vivo</i> zu einer Hyperphosphorylierung und <i>in vitro</i> zu einer schnelleren Dephosphorylierung	74

5.12 Die verbesserte kooperative DNA-Bindung führt zu einer besseren transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen mit Mehrfach-GAS-Stellen.....	77
5.13 Ergebnisse der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen-Analyse.....	81
6 Diskussion	83
7 Literatur	97
Danksagung	117
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Anhang	118

1 Abkürzungen und Fachbegriffe

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Absorption, Ampère
Å	Angström
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	Coiled-coil-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
CIITA	MHC-II-Klasse-II-Transaktivator
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dIdC	Desoxyinosid-Desoxycytidin
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay
EtOH	Ethanol

FBS	fötales Rinderserum
g	Erdbeschleunigung
GAS	Gamma-aktivierte Stelle
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICAM-1	Intrazelluläres-Adhäsions-Molekül-1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-Rezeptor α/β
IFNGR	Interferon-gamma-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulierter Faktor
ISGF	Interferon-stimulierter Genfaktor
JAK	Janus-Kinase
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LB	Luria-Broth
LD	Linkerdomäne
LiCl	Lithiumchlorid
LMB	Leptomycin B
LMP	Low-Molecule-Weight-Polypeptid
m	milli, meter
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCM	Minichromosome-Maintenance
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

Min.	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natrium-ortho-Vanadat
ND	Aminoterminal Domäne
NES	nukleäres Exportsignal
Nmi	N-Myc-Interactor
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
OD	optische Dichte
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT
PK	Proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sek.	Sekunde
SH2	Src-Homologie 2
SOCS	Suppressoren des Zytokin-Signalweges
SSCP	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse
STAT	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TC-PTP	T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase
TE	Tris-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol
U	Units
USF	Upstream-Transkriptionsfaktor
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Proteinogene Aminosäuren: Abkürzungen

Tab. 1: Proteinogene Aminosäuren und ihr 1-Buchstabencode.

Aminosäure	1-Buchstabencode	Aminosäure	1-Buchstabencode
Alanin	A	Methionin	M
Cystein	C	Asparagin	N
Aspartat	D	Prolin	P
Glutamat	E	Glutamin	Q
Phenylalanin	F	Arginin	R
Glycin	G	Serin	S
Histidin	H	Threonin	T
Isoleucin	I	Valin	V
Lysin	K	Tryptophan	W
Leucin	L	Tyrosin	Y

2 Einleitung

In mehrzelligen Organismen fungieren die Zytokine als wichtige Botengruppe zur Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und Organen. Zytokine sind an einer Interaktion mit der Umwelt beteiligt und gewährleisten eine schnelle Reaktion auf sich ändernde Bedingungen. Sie haben einen zentralen Stellenwert in der Steuerung der Immunantwort und der Kontrolle des Aktivitätszustands immunkompetenter Zellen. Zudem spielen Zytokine eine wichtige Rolle bei Wachstums-, Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Zytokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa (Schooltink und Rose-John, 2002), welche an spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche binden können. Ihre intrazelluläre Wirkung üben Zytokine über Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) aus. Nach Bindung des Zytokins an seinem spezifischen Rezeptor kommt es im carboxyterminalen Rezeptormolekül zu Konformationsänderungen, die zur Aktivierung von STAT1-Proteinen führen. Dies löst eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus, die innerhalb weniger Minuten zu einer Änderung des Genexpressionsprofils führt.

Aufgrund ihrer strukturellen Merkmale teilt man die Zytokine in unterschiedliche Gruppen ein (Thomson, 1998; Nicola, 1994). Zu den Zytokinen zählen zahlreiche Wachstumshormone und Interleukine (IL). Diese sind maßgeblich an der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Immunantwort beteiligt. Ebenfalls zu den Zytokinen gehören die für diese Arbeit bedeutsamen Interferone (IFN). Diese haben antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften. Die Bezeichnung haben die Interferone aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interferenz mit Virusinfektionen erhalten (Isaacs und Lindenmann, 1957). Sie bilden damit die erste Abwehr gegen virale Infektionen und spielen zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Überwachung maligner Zellen durch das Immunsystem (Kaplan et al., 1998). Die IFN-Familie besteht aus drei Gruppen: den Typ-I-Interferonen α/β , ω und τ , dem Typ-II-Interferon γ und dem Typ III-Interferon λ (Platanias, 2005). Die Typ-I-Interferone werden nach Virusinfektion in Leukozyten und Fibroblasten produziert und binden an den Interferon- α -Rezeptor (IFNAR). Dieser besteht aus zwei Untereinheiten: IFNAR1 und IFNAR2, die auf der Oberfläche von kernhaltigen Zelltypen exprimiert werden (Novick et al, 1994). Die Transkription des IFN γ -Gens erfolgt nach Aktivierung durch

Antigen-präsentierende Zellen nur in T-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten (Boehm et al., 1997; Frucht et al., 2001). IFN γ bindet an einen eigenen Klasse-II-Zytokin-Rezeptor IFNGR (Interferon-Gamma-Rezeptor), dieser wird ebenfalls an der Zelloberfläche sämtlicher kernhaltiger Zellen, nicht aber der Erythrozyten, exprimiert (Langer und Pestka, 1988). Alle Zytokin-Rezeptoren bestehen aus einer Ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer die Zellmembran einmal durchquerenden Transmembran-Domäne sowie einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne. Die Bindung des Zytokins induziert eine Dimerisierung oder Oligomerisierung der Rezeptor-Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 sowie IFNGR1 und IFNGR2. Ligandenbindung bewirkt über eine Aktivierung des Rezeptor-Komplexes die Weiterleitung des Signals in den Zellkern und initiiert eine Änderung des Expressionsprofils einer Zelle (Darnell et al., 1994).

Eine Hauptaufgabe der Interferone ist die Abwehr von Virusinfektionen durch Induktion der Transkription von Komponenten des Immunsystems. Die Interferon-Wirkung beruht dabei auf der Erkennung von viraler RNA, dazu sind unterschiedliche Mechanismen bekannt. Zum Einen werden die GTPasen Mx transkriptionell aktiviert, diese inhibieren die Transkription viraler RNA (Frese et al., 1996). Zum Anderen wird die Expression von 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen induziert, welche kurze 2'-5'-Oligoadenylat-Fragmente produzieren, die an RNase L binden und diese aktivieren. Die aktivierte RNase L zerstört die einzelsträngige RNA in der Zelle und inhibiert somit die Virusreplikation (Cirino et al., 1997; Diaz-Guerra et al., 1997). Ein weiterer Weg geht über die Zytokin-abhängige Expression der Proteinkinase R (PKR), diese inaktiviert den Translations-Initiationsfaktor eIF2 und dies resultiert in einer supprimierten Translation viraler Proteine (Meurs et al., 1992; Zhao et al., 1996). Zusätzlich induzieren Zytokine die Expression von Bestandteilen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC). Dies geschieht bei MHC I über einen Interferon-regulierten-Faktor-1 (IRF1)-abhängigen Weg, der über Typ-I- und Typ-II-Interferone gesteuert wird (Chang et al., 1992). Bei MHC II erfolgt die Steuerung durch IFN γ über MHC-II-Klasse-II-Transaktivatoren (CIITA) (Mach et al., 1996; Boehm et al., 1997; Zhao et al., 2007). Weiterhin hemmen Interferone das Wachstum infizierter Zellen und sensibilisieren sie gegenüber apoptotischen Stimuli. Außerdem aktiviert IFN γ in Makrophagen die Produktion zytotoxischer, reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies und reduziert die Differenzierung von T-Helferzellen (MacMicking et al., 1997).

Während des Studiums der Genregulation durch Interferone kam es zur Entdeckung des JAK/STAT-Signalweges (Darnell et al., 1994). Dieser beschreibt den Weg eines extrazellulären Signals in Form eines Zytokins über die Detektion durch einen Rezeptor bis hin zur spezifischen Reaktion in der Zelle. Der Signalweg beinhaltet die Phosphorylierung von Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) durch Rezeptor-assoziierte Kinasen. Nach Bindung des Zytokins an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten und damit zu einer Aktivierung von Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (JAKs). Im Falle einer IFN γ -Aktivierung bindet dieses Interferon an die Untereinheit IFNGR1 des IFNGR-Rezeptors, ein homodimerer Rezeptorkomplex bildet sich aus. Die Tyrosinkinase JAK1 ist nicht-kovalent mit IFNGR1 assoziiert und beinhaltet eine Bindungssequenz für STAT1. Nach Transphosphorylierung des Rezeptors und der JAKs binden unphosphorylierte STATs mit ihrer Src-Homology-2 (SH2)-Domäne an einen Phosphotyrosinrest des Rezeptors. Anschließend werden die STATs durch JAKs an einem in der STAT-Familie invarianten Tyrosinrest in der carboxyterminalen SH2-Domäne phosphoryliert (Shuai et al., 1993). Dies induziert eine Homo- oder Heterodimerisierung von phosphorylierten STAT-Monomeren über eine Wechselwirkung des Phosphotyrosins des einen Monomers mit einem Arginin-Rest in der SH2-Tasche des anderen und ermöglicht die Dissoziation vom Rezeptor (Shuai et al., 1994; Greenlund et al., 1995; Becker et al., 1998; Chen et al., 1998). Danach kommt es binnen weniger Minuten zu einer Kernakkumulation (Schindler et al., 1992; Shuai et al., 1992; Melén et al., 2001; Fagerlund et al., 2002).

Der nukleäre Import erfolgt über einen durch Ran-GTPasen angetriebenen Prozess nach STAT-Bindung an Importine (Sekimoto et al., 1996; Sekimoto et al., 1997; Ma und Cao, 2006). Die Tyrosin-phosphorylierten STAT-Dimere sind hoch-affine DNA-Bindeproteine und bewirken durch ihre Bindung an spezifische Promotor- oder Enhancerregionen die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen (Decker et al., 1997; Stark et al., 1998). Durch die Phosphatase TC45 werden die STAT1-Dimere nach Dissoziation von DNA dephosphoryliert und somit inaktiviert (ten Hoeve et al., 2002). Inaktiviertes STAT1 wird in das Zytoplasma exportiert, wo in Abhängigkeit vom Rezeptorzustand ein erneuter Aktivierungszyklus beginnen kann. Zusätzlich wurde von Meyer et al. (2004) beschrieben, dass STAT-Proteine auch ohne Zytokin-Stimulation fortwährend zwischen Zellkern und Zytoplasma translozieren.

Der JAK/STAT-Signalweg stellt somit eine direkte Signalweiterleitung ohne Beteiligung weiterer Botenstoffe dar und ermöglicht eine Genaktivierung binnen weniger Minuten mit hoher Signalerhaltung und Spezifität aufgrund der Affinitäten der STAT-Dimere zu ihren natürlichen DNA-Bindemotiven und der hochspezifischen Interaktion der Tyrosin-phosphorylierten Bindestellen der Zytokin-Rezeptoren mit der SH2-Domäne der STATs (Greenlund et al., 1995; Heim et al., 1995; Schindler et al., 1995; Ehret et al., 2001).

STAT-Proteine wurden im Schleimpilz *Dictyostelium*, in Nematoden und Insekten (Yan et al., 1996; Kawata et al., 1997; Liu et al., 1999; Barillas-Mury et al., 1999) sowie in Vertebraten (Oates et al., 1999; Pascal et al., 2001; Sung et al., 2003) gefunden. Die STAT-Familie ist in sämtlichen tierischen Organismen evolutionär hochkonserviert, jedoch nicht in Pflanzen und Pilzen (Darnell, 1997). Beim Menschen besteht sie aus sieben Mitgliedern: STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b und STAT6. STAT5a und -5b werden durch zwei unterschiedliche Gene auf Chromosom 17 kodiert. Die Gene für humanes STAT1 und -4 sind auf Chromosom 2, für STAT2 und -6 auf Chromosom 12 und für STAT3 auf Chromosom 1 lokalisiert (Copeland et al., 1995).

Alle STAT-Proteine haben eine Länge von 700-800 Aminosäuren (AS) und bestehen aus einer aminoterminalen Domäne, DNA-Bindedomäne, SH2-Domäne, Linker-Domäne und einer carboxyterminalen Transaktivierungs-Domäne (Darnell, 1997; Horvath, 2000; Levy und Darnell, 2002). Sie enthalten einen kritischen Tyrosinrest im C-Terminus, welcher nach Aktivierung phosphoryliert wird (Schindler et al., 1992; Shuai et al., 1992; Shuai et al., 1993). Bei STAT1, -3, -5a und -5b befindet sich zusätzlich ein konservierter Serinrest im carboxyterminalen Bereich, welcher von Serin- und Threonin-Kinasen phosphoryliert wird (Zhang et al., 1995).

Durch Funktionsanalysen mittels Gen-Deletions-Experimenten von STAT- bzw. Rezeptor-Genen konnten einzelne STAT-Proteine ihren zytokinspezifischen Signaltransduktionswegen zugeordnet werden (Akira, 1999; Kisseleva et al., 2002; Levy und Darnell, 2002; O'Shea et al., 2002). Durch Interferon oder epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) stimuliertes STAT1 (Chin et al., 1996; Bromberg et al., 1998) und STAT2 (Park et al., 2000; Zimmermann et al., 2005; Zhao et al., 2007) spielen demnach eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen durch Inhibierung des Zellwachstums über IRF1 oder p21. STAT1 kann zudem durch den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) oder IFN γ aktiviert werden und Apoptose über die Regulation der basalen Expression von Caspasen (Chin et al., 1997; Kumar et

al., 1997) oder über einen Fas-abhängigen Weg (Lee et al., 2000; Ouchi et al., 2000) auslösen. STAT3 (Fukada et al., 1996; Takeda et al., 1998), -5a und -5b (Fujii et al., 1995; Chretien et al., 1996; Friedmann et al., 1996) werden durch eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert und wirken, wie auch STAT4 (Zhong et al., 1994) und -6 (Kaplan et al., 1996; Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996), proliferativ und antiapoptotisch. STAT3 wird mit zellulärer Transformation und Tumorprogression in Verbindung gebracht (Bowman et al., 2000) und hat in Teilen antagonistische Effekte zu den Wirkungen von STAT1 (Townsend et al., 2004). STAT5a und -5b sind in der Aminosäuresequenz zu 96% identisch und werden unter anderem durch das Hormon Erythropoetin (EPO) aktiviert. STAT4 wird durch IL-12 in T-Zellen aktiviert und STAT6 durch IL-4 und IL-13 (Jacobsen et al., 1995). STAT2 ist zusammen mit STAT1 an der Typ-I-Interferon-induzierten antiviralen Immunantwort beteiligt (Park et al., 2000).

Allen STAT-Proteinen ist ein modularer Aufbau aus sechs strukturell und funktionell konservierten Domänen gemeinsam. Die Domänenorganisation ist in **Abb. 2** anhand von STAT1 dargestellt.

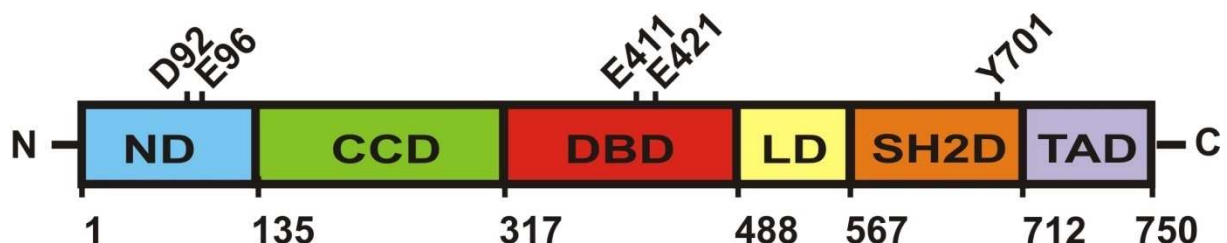


Abb. 1: Domänenstruktur von STAT1α.

Diese Struktur ist innerhalb der STAT-Familie konserviert und besteht aus einer aminoterminalen Domäne (ND, 135 AS). An diese schließen sich das 4-Helix-Bündel (Coiled-Coil-Domäne, CCD, 182 AS) und die DNA-Bindedomäne (DBD, 171 AS) an. Über die Linker-Domäne (LD, 88 AS) sind diese mit der SH2-Domäne (SH2D, 136 AS) verbunden, welche den invarianten phosphorylierbaren Tyrosin701-Rest enthält. Am carboxyterminalen Ende befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD, 38 AS), diese ist in der Spleissvariante STAT1β nicht vorhanden. Die in dieser Arbeit mutierten Aminosäuren D92, E96, E411 und E421 sind in den jeweiligen Domänen markiert.

Die Funktionen der Domänen wurden durch Sequenzvergleiche und Mutationsstudien ermittelt (Becker et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998; Soler-Lopez et al., 2004; Mao et al., 2005). Die aminoterminal Domäne ist in der STAT-Familie stark konserviert und besteht bei STAT1 aus 135 AS, sie kann *in vitro* proteolytisch vom sogenannten Kernfragment abgespalten werden (Vinkemeier et al., 1996; Murphy et al., 2000). Durch Austausch-Experimente wurde gezeigt, dass die aminoterminalen Do-

mänen der verschiedenen STATs jedoch untereinander nicht beliebig auswechselbar sind (Strehlow und Schindler, 1998; Murphy et al., 2000). Die Hauptfunktion dieser Domäne scheint in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zu liegen. Über sie erfolgt eine Wechselwirkung zwei benachbarter Dimere, welche eine kooperative DNA-Bindung zweier Dimere an benachbarten Gamma-aktivierten-Stellen (GAS) ermöglicht und damit die Stabilität der DNA-Bindung erhöht (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996; Stark et al., 1998; John et al., 1999). Diese Fähigkeit zur Homodimerisierung wurde bereits in der Kristallstruktur der isolierten aminoterminalen Domäne von STAT4 gezeigt (Vinkemeier et al., 1998). Die aminoterminal Domäne wird auch mit der Rekrutierung von Phosphatasen in Verbindung gebracht; N-terminal deletierte STAT1-Varianten zeigen eine nahezu irreversible Tyrosin-Phosphorylierung (Shuai et al., 1996; Strehlow und Schindler, 1998; Meyer et al., 2004). Zusätzlich wurden Interaktionsoberflächen des STAT1-Aminoterminus mit dem Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT (PIAS1) (Liao et al., 2000), dem CREB-bindendem Protein (CBP/p300) (Horvath, 2000) und Zytokin-Rezeptoren (Leung, 1996; Murphy 2000) identifiziert. Der Aminoterminus von STAT1 wird auch für den Kernimport des phosphorylierten STAT1-Dimers benötigt (Meissner et al., 2004). Im Übergangsegment zwischen Aminoterminus und Vier-Helix-Bündel befindet sich ein flexibler Bereich (AS 116-142), der für Interaktionen zwischen Dimeren und für Dephosphorylierung wichtig ist. Dabei ist nicht die Aminosäuresequenz, sondern die Länge dieses Bereichs von Bedeutung (Mertens et al., 2006).

Mit der aminoterminalen Domäne ist die Coiled-coil-Domäne flexibel verbunden, deren strukturelles Hauptelement aus vier α -Helices besteht. Das Vier-Helix-Bündel enthält ein nukleäres Exportsignal (Begitt et al., 2000). Die davon carboxyterminal lokalisierte DNA-Bindedomäne, bestehend aus β -Faltblattstrukturen und Schleifen, enthält eine Region, die für die Erkennung palindromischer DNA-Sequenzen verantwortlich ist. Über Protein-DNA-Wechselwirkungen (Sadowski et al., 1993) tritt die DNA-Bindedomäne mit der DNA in Kontakt, dabei bindet jedes phosphorylierte Monomer eine halbe palindromische GAS-Stelle. Die Bindung an DNA findet mit der großen sowie der kleinen Furche der Doppelhelix statt. Dabei wurde gezeigt, dass die Aminosäurereste N460 und K336 mit der großen und E421 mit der kleinen Furche in Kontakt stehen (Chen et al., 1998).

Mutationen in dem Bereich des DNA-Kontaktes führen zu einem Verlust der spezifischen DNA-Bindung (Darnell, 1997; Decker et al., 1997; Stark et al., 1998; Williams,

2000). Interessante Beispiele dafür sind die DNA^{plus}-Mutante (T327R, V426H und T427H) und die DNA^{minus}-Mutante (V426D, T427D) (Meyer et al., 2003). Die DNA^{plus}-Mutante zeigt im Gegensatz zu STAT1-WT eine unspezifische Bindung an Nicht-GAS-Elementen. Zugleich ist diese Mutante in IFN γ -stimulierten Zellen viel länger als das Wildtyp-Protein Tyrosin-phosphoryliert und zeigt eine verlängerte Dauer der Zytokin-induzierten Kernakkumulation. Obwohl die DNA^{plus}-Mutante mit höherer Affinität sequenzunspezifisch an DNA bindet als STAT1-WT, werden STAT1-Zielgene durch sie transkriptionell nicht aktiviert. Die DNA^{minus}-Mutante bindet dagegen weder an GAS-Stellen noch an Nicht-GAS-Stellen an der DNA, hat also einen vollständigen Verlust der DNA-Kontaktierung und akkumuliert dadurch auch nicht im Zellkern. Zu den Zielgenen von STAT1 gehören Regulatoren, die über negative Rückkopplung die STAT1-Funktion inhibieren können, z.B. Suppressoren des Zytokin-Signalweges (SOCS) (Starr et al., 1997), sowie zahlreiche Gene, welche bei der Immunantwort oder Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Horvath, 2000). Eine weitere Aufgabe der DNA-Bindedomäne ist der Kernimport; sie enthält ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) (Meyer et al., 2002), welches mit Importin $\alpha 5$ wechselwirkt (McBride et al., 2002; Ma und Cao, 2006).

Die Linker-Domäne verbindet die DNA-Bindedomäne mit der SH2-Domäne und beinhaltet helikale Strukturen. Bei STAT1 ist sie an der DNA-Bindung mutmaßlich durch Auslösung von strukturellen Änderungen in der SH2-Domäne und damit an der Regulation der transkriptionellen Aktivität beteiligt (Chen et al., 1998; Yang et al., 1999). Zusätzlich scheint sie für die STAT1-Bindung an den Kernporen-Komplex und damit für die Regulation der nukleocytoplasmatischen Translokation notwendig zu sein (Marg et al., 2004).

Die SH2-Domäne ist innerhalb der STAT-Familie die am stärksten konservierte Domäne. Sie ist für die Signalweiterleitung von großer Bedeutung, da sie die Bindung von STAT an Phosphotyrosin-Reste von Zytokin-Rezeptoren (Greenlund et al., 1995; Schindler et al., 1995) sowie die Homo- und Heterodimerisierung mit anderen STATs (Shuai et al., 1994; Gupta et al., 1996) ermöglicht. Die Dimerisierung erfolgt über reziproke Wechselwirkung der SH2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosinrests des anderen STAT1-Moleküls (Shuai et al., 1993), dabei erkennt der konservierte Arginin-Rest in Position 602 den Phosphotyrosinrest in Position 701, die Koordination erfolgt über ein Lysin in Position 584. Die SH2-Interaktion wird fast ausschließlich

durch die Aminosäurereste 701-708 vermittelt (Shuai et al., 1994). Zusätzlich interagiert die SH2-Domäne mit Janus-Kinasen (Gupta et al., 1996).

In der Transaktivierungsdomäne von STAT1 ist der kritische Tyrosinrest in Position 701 lokalisiert, welcher von Rezeptor-assoziierten Jak-Kinasen phosphoryliert wird (Schindler et al., 1992; Shuai et al., 1992; Chatterjee-Kishore et al., 2000). Außerdem enthält die Transaktivierungsdomäne einen Serinrest in Position 727, der für eine maximale transkriptionelle Aktivität an bestimmten Zielgenen phosphoryliert sein muss (Wen et al., 1995; Zhang et al., 1995; Decker und Kovarik, 2000). Durch alternatives Spleißen entsteht eine carboxyterminal verkürzte STAT1-Variante (STAT1 β), welche zwar nach Tyrosin-Phosphorylierung dimerisieren und DNA binden kann, jedoch keine Zielgene aktiviert. Diese Variante stellt somit einen dominant-negativen Regulator des Vollelänge-Proteins STAT1 α dar. Die Transaktivierungsdomäne ist die am wenigsten konservierte Domäne der STAT-Familie, dies trägt wahrscheinlich zu unterschiedlichen Zielgenspezifitäten der unterschiedlichen STATs bei. Weiterhin vermittelt sie Protein-Protein-Wechselwirkungen mit CBP/p300 (Zhang et al., 1996), MCM5 (Zhang et al., 1998) und BRCA1 (Ouchi et al., 2000).

Die dreidimensionale Struktur des Tyrosin-phosphorylierten, DNA-gebundenen STAT1-Homodimers konnte mittels Röntgenstrukturanalyse entschlüsselt werden (Chen et al., 1998). Beschrieben wurden die Aminosäuren 132-713 in einer Auflösung von 2,9 Å, es fehlen die N-Domäne und die Transaktivierungsdomäne. Das trunkierte Dimer wurde mit einem 18-mer Duplex kokristallisiert, welches eine STAT1-Bindestelle enthält. Die Struktur erinnert an einen Nussknacker oder eine Zange; Coiled-coil-Domäne, DNA-Bindedomäne, Linkerdomäne und SH2-Domäne zeigen starke Interaktionen zwischen den Domänen und formen somit einen hydrophoben Kern.

Im Jahr 2005 wurde von Mao et al. die Kristallstruktur von unphosphoryliertem STAT1 mit einer Auflösung von 3,0 Å gezeigt. Dazu wurde humanes STAT1, AS 1-683, mit einem Phosphopeptid, welches aus der α -Kette des IFN γ -Rezeptors stammt und aus fünf Resten besteht, kokristallisiert. Erhalten wurde eine Tetramerkonformation, welche zwei Berührungsflächen aufweist. Eine befindet sich zwischen zwei Aminotermi (AS 1-123) und die andere zwischen zwei Kernfragmenten (AS 132-683). Weiter wurde gezeigt, dass unphosphoryliertes STAT1 überwiegend als Dimer vorliegt, welches über aminoterminal-aminoterminal Wechselwirkungen zusammen gehalten wird. Die Verbindung zwischen aminoterminaler Domä-

ne und dem Kernfragment ist flexibel und ermöglicht zwei ineinander umwandelbare Orientierungen der STAT-Proteine in eine antiparallele bzw. parallele Anordnung. Es ist weiterhin unklar, welcher Aminoterminus und welches Kernfragment von einem Molekül der tetrameren Struktur stammen.

Von Vinkemeier et al. (1998) und Chen et al. (2003) wurden anhand der Kristallstruktur der aminoterminalen Domäne von STAT4 zwei mögliche Berührungsflächen für aminoterminal Interaktionen identifiziert. Über aminoterminal-aminoterminal Wechselwirkungen wird eine kooperative Bindung von STAT1 auf DNA ermöglicht. Mutationen zur Identifizierung der physiologisch relevanten Dimer-Kontaktflächen führten zum Ergebnis, dass die neu beschriebene Berührungsfläche wahrscheinlich die physiologisch relevante Struktur ist. In dieser Form liegen die C-terminalen Seitenketten ca. 64 Å auseinander. Dies bedeutet, dass die Aminotermini zwischen zwei benachbarte STAT-Dimere, welche an Tandemstellen auf DNA gebunden sind, ohne Lücke positioniert werden können. Diese Struktur wurde durch Mutation der zu STAT4-L77 korrespondierenden Aminosäure in STAT1 (F77) zu Alanin bestätigt. Die STAT1-F77A-Mutante ist mit einem Verlust der Tetramerstabilisierung auf DNA assoziiert (Meyer et al., 2004).

STAT1 wird über den JAK/STAT-Weg aktiviert, dabei induziert eine IFN α -Stimulation überwiegend eine Heterodimer-Bildung aus STAT1 und STAT2. Diese bilden mit dem Protein Interferon-regulierter Faktor 9 (IRF-9) einen Komplex, welcher als Interferon-stimulierter Genfaktor 3 (ISGF3) bezeichnet wird. Dieser Komplex führt zu einer Aktivierung der Transkription von Genen mit Interferon-stimulierten Response (ISR)-Elementen im Promotor. Eine IFN γ -Stimulation führt dagegen zu einer überwiegenden Bildung von STAT1-Homodimeren. Diese binden an GAS-Sequenzen (Müller et al., 1993; Darnell et al., 1994) und können zusätzlich an repetitiven STAT-Zielsequenzen mit benachbarten Dimeren über aminoterminal Interaktionen oligomerisieren (Seidel et al., 1995; Horvath et al., 1995; Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996; Decker et al., 1997; John et al., 1999). Die Aktivierung der Genexpression durch STAT1 wird im Zellkern durch PIAS unterdrückt. PIAS interagiert mit STAT1-Transkriptionsfaktoren und verhindert somit die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen in interferonabhängigen Promotoren (Naka et al., 1997; Liu et al., 1998; Liao et al., 2000; Shuai, 2000; Weber et al., 2009). Ein weiterer negativer Regulator der STAT-Signalkaskade sind SOCS-Proteine. Diese binden an Rezeptoren oder

katalytisch aktive JAK-Proteine und verhindern dadurch eine weitere STAT-Aktivierung.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass STAT1-Dimere durch die Phosphatase TC45 dephosphoryliert werden (ten Hoeve et al., 2002), was die Dauer der Kernakkumulationsphase begrenzt (Haspel et al., 1996; Haspel und Darnell, 1999). Die Dephosphorylierung des Tyrosin701-Rests der STAT1-Dimere erfordert eine erhebliche räumliche Umstellung der Monomere. Dies geschieht über Interaktionen der N-Domänen (Mertens et al., 2006). Wie in **Abb. 2** gezeigt, lagern sich die Tyrosinphosphorylierten parallelen STAT1-Dimere in eine antiparallele Form um. Erst diese Konformation ermöglicht den Zugang der Phosphatase. Während der Dephosphorylierung bleiben die beiden Monomere zusammen. STAT1-Dimere liegen in der DNA-gebundenen Form in einer parallelen Konformation vor. Bei dieser Strukturanordnung gibt es keinen Kontakt der N-Domänen des Dimers untereinander. Nach Dissoziation von DNA dimerisieren die N-Domänen, da sie über eine flexible AS-Kette verbunden sind (Chen et al., 1998), und unterstützen die Loslösung der reziproken Phosphotyrosin-SH2-Bindung der STAT1-Dimere; die aminoterminalen Dimerisierung bleibt bestehen. Der Innenteil der Monomere rotiert und ermöglicht somit eine reziproke Assoziation der Coiled-coil-Domäne und DNA-Bindedomäne, dabei wird der Phosphotyrosinrest an beiden Enden des antiparallelen Dimers zur Dephosphorylierung freigegeben.

Die Tyrosin-Phosphorylierung reguliert dabei den Anteil der beiden Dimerkonformationen (Wenta et al., 2008). Im unphosphorylierten Zustand wird die antiparallele Form bevorzugt, diese wird über großflächige Wechselwirkungen der N-Domänen stabilisiert. Nach Tyrosin-Phosphorylierung wird die parallele Struktur mit Stabilisation durch Phosphotyrosin-SH2-Domänen-Interaktionen bevorzugt. Dies ermöglicht erst die DNA-Bindung und damit eine Akkumulation im Kern. Die Dimerbildung von STAT1 erfolgt unabhängig vom Phosphorylierungsstatus und in antiparalleler sowie paralleler Form. Es wurde auch gezeigt, dass die Tyrosin-Phosphorylierung für die DNA-Bindung nicht essentiell ist, aber sie verstärkt die Ausbildung der parallelen Struktur und erhöht somit die DNA-Bindeaktivität von STAT1 um mehr als das 200fache (Wenta et al., 2008). Zusätzlich gehen die N-Domänen in der parallelen Form in eine offene Konformation über und ermöglichen dadurch Interaktionen mit benachbarten Dimeren, so dass Tetramerstrukturen nachgewiesen werden können. Diese sind in der antiparallelen Form nicht möglich.

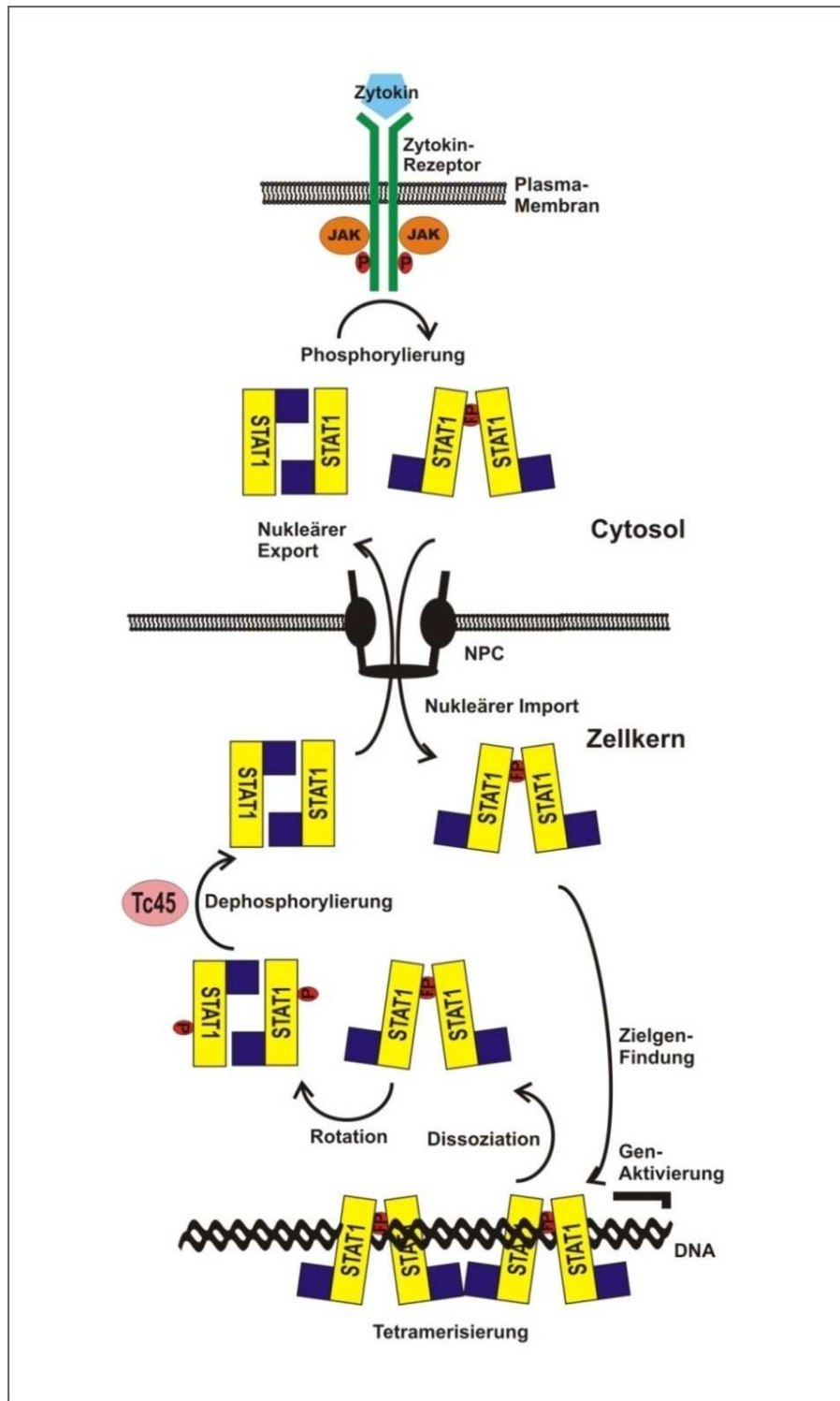


Abb. 2: Modell der Konformationsänderung und Dephosphorylierung von STAT1.

Gezeigt ist die Zytokin-Aktivierung von STAT1, welches nach Phosphorylierung und Dimerisierung in den Zellkern transloziert. Dort liegen die STAT1-Dimere in phosphorylierter und paralleler Form vor und können an DNA binden. Nach Dissoziation von DNA erlaubt die Flexibilität der freien STAT1-Dimere einen Kontakt zwischen korrespondierenden N-Termini, dies induziert die Loslösung der Phosphotyrosin-SH2-Bindung. Das Dimer bleibt über aminoterminalen Wechselwirkungen zusammen. In der antiparallelen Form kommt es zu einer Interaktion zwischen der Coiled-coil-Domäne und der DNA-Bindedomäne verschiedener Monomere. In dieser Konformation ist das phosphorylierte Tyrosin701 für die TC45-Phosphatase frei zugänglich und es kommt zur Dephosphorylierung. Dies ermöglicht den Export des antiparallelen, unphosphorylierten STAT1-Dimers in das Cytoplasma. Die roten Punkte zeigen phosphoryliertes Tyrosin701 an, die blauen Vierecke stellen die Aminotermine dar.

Durch Aktivierung von STAT1 erhöht sich innerhalb von Minuten die transkriptionelle Aktivität an Interferon-regulierten Genen. Nachgewiesen wurde dies mittels Gen-Array-Analysen, die zeigten, dass die Konzentration vieler mRNAs mehr als vierfach und die Konzentration weiterer 50-100 mRNAs um das Doppelte erhöht war (Der et al., 1998). Dabei ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Tetrameren für die Zytokin-abhängige Genaktivierung sehr wichtig. Es gibt viele zweifache STAT-Bindestellen in Genen, ca. 20 bp voneinander entfernt, welche durch Tetramere besetzt werden können. In Versuchen mit STATs ohne N-Domänen, die dadurch nicht zur Tetramerbildung fähig sind, konnte gezeigt werden, dass kooperative DNA-Bindung an Tandem-Stellen stattfindet (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996). Für STAT3 und STAT5 wurde gezeigt, dass eine Tetramerbildung die DNA-Bindung an benachbarten Bindestellen deutlich verstärkt und somit für eine maximale transkriptionelle Aktivierung an bestimmten natürlichen Promotoren notwendig ist (John et al., 1999; Zhang und Darnell, 2001). Soweit bekannt kommt es nicht zu einer Dimer-Dimer-Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Mitgliedern der STAT-Familie; die verschiedenen STATs werden jeweils von spezifischen Liganden aktiviert und haben ungleiche Zielgene.

Es ist nicht genau bekannt, wie eine kooperative DNA-Bindung die Transkription erhöht. Gut belegt ist allerdings, dass STAT1 nach Bindung an DNA mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren assoziiert. Details darüber, wie die transkriptionelle Aktivität dabei erhöht wird, sind aber nur unzureichend entschlüsselt. Ein Beispiel für die Rekrutierung eines Koaktivators ist die Bindung von CBP/p300 an die Transaktivierungsdomäne. Dazu ist ein Leucin in Position 724 maßgeblich beteiligt (Sun et al., 2005; Wojciak et al., 2009). Krämer et al. (2008) postulierten, dass eine Acetylierung von STAT1 die Bindung der TC45-Phosphatase induziert und somit die Dephosphorylierung einleitet. Wahrscheinlich binden aber auch andere Regionen, darunter die N-Domäne, an Koaktivatoren (Horvath, 2000; Zhang et al., 1997). Ein Austausch der STAT1-Transaktivierungsdomäne durch die anderer STATs führt zu keiner Änderung im Profil der Genexpression. Dies zeigt, dass die Transaktivierungsdomäne keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Spezifität der Generkennung hat (Shen und Darnell, 2001). Ein Beispiel für den Einfluss von Koaktivatoren ist die Beteiligung von Minichromosome-Maintenance-5 (MCM5), welches an Serin-phosphoryliertem mit höherer Affinität bindet als an unphosphoryliertem STAT1 (Zhang et al., 1998).

Es konnte auch gezeigt werden, dass STAT1 mit Histon-Acetyltransferasen (HATs) interagiert, dabei speziell mit p300/CBP (Horvath et al., 2000; Paulson et al., 1999). Es ist unwahrscheinlich, dass STAT1 alleine die Transkription aktiviert, es interagiert vielmehr mit anderen sequenzspezifischen DNA-Bindeproteinen. Für eine maximale STAT1-abhängige transkriptionelle Aktivität ist eine Interaktion von STAT1 mit dem Transkriptionsaktivator Sp1 und dem Upstream-Transkriptionsfaktor 1 (USF-1) gezeigt worden (Look et al., 1995; Mühlethaler-Mottet et al., 1998). Weiterhin wechselwirkt STAT1 mit dem N-Myc-Interactor (Nmi) (Zhu et al., 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass STAT1 nahe an Regionen des Genoms bindet, welche eine regulierte transkriptionelle Aktivität aufweisen. Es wird vermutet, dass STAT1 eine Rolle bei der direkten Rekrutierung des RNA-Polymerase-II-Komplexes an Promotoren von IFN γ -sensitiven Genen spielt (Wormald et al., 2006).

Ein weiterer Aspekt in der Genaktivierung ist die transkriptionelle Aktivität von unphosphoryliertem STAT1. Erste Hinweise darauf, dass unphosphoryliertes STAT1 eine Rolle in der Genexpression spielt, erbrachten Experimente mit STAT1-negativen U3A-Zellen. Erst nach Transfektion mit STAT1-kodierenden Plasmiden, wurde in STAT1-rekonstituierten Zellen eine apoptotische Reaktion auf den Tumornekrosefaktor α (TNF α) beobachtet (Kumar et al., 1997). Auch die Expression der STAT1-Y701 Mutante, welche nach Substitution des kritischen Tyrosinrests nicht mehr phosphoryliert werden kann, führt zu einer STAT1-abhängigen Apoptoseinduktion (Kumar et al., 1997). Gen-Arrays von U3A-Zellen und Zellen mit wiederhergestellter STAT1-Präsenz wurden ohne Stimulation mit IFN γ verglichen. Dabei wurden Gene gefunden, welche nicht IFN-abhängig waren und deren mRNAs nach STAT1-Expression in den Zellen nachgewiesen werden konnten (Ramana et al., 2002). Eines dieser Gene ist das Low-Molecular-Weight-Polypeptide-2 (LMP-2). STAT1 wurde an dem Promotor des LMP-2-Gens ohne vorherige Stimulation mit IFN γ gefunden, dabei konnte keine Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Dieser Befund zeigt, dass unphosphoryliertes STAT1 eine bislang wenig beachtete Rolle bei der Genexpression von Zytokin-unabhängigen Genen spielt.

Transkriptionsfaktoren sind äußerst wichtig für biologische Auswirkungen im ganzen Organismus. Signaltransduktionswege, die an der Zelloberfläche beginnen und über transkriptionell aktive Proteine in den Zellkern gehen, sind in Tumorzellen oft dysfunktionell (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Es ist bekannt, dass STAT3 eine

wichtige Rolle in vielen menschlichen Krebserkrankungen spielt (Bowman et al., 2000; Song und Grandis, 2000). Auch STAT1 wurde in Zusammenhang mit Tumorentstehungen, wie Brustkrebs, Hautkarzinome, Melanome, Leukämie und Lymphome, gebracht (Boudny et al., 2003; Kovarik et al., 2003; Boudny et al., 2005). STAT1-Knock-out-Mäuse waren besonders anfällig für chemisch induzierte und für transplantierbare Tumore (Kaplan et al., 1998; Lee et al., 2000a/b). Der Befund, dass STAT1 für Apoptose benötigt wird (Chin et al., 1996; Kumar et al., 1997; Su et al., 1997; Bromberg et al., 1998; Sahni et al., 2001), verweist auf einen neuen Mechanismus, wie dysfunktionelles STAT1 an der Tumorentwicklung und -entstehung beteiligt sein kann. Konstitutive Aktivierung von STAT1 wurde in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gefunden (Aronica et al., 1996; Gouilleux-Gruart et al., 1996; Weber-Nordt et al., 1996).

Der JAK/STAT-Signalweg hat auf die Entstehung und Entwicklung von Herzinsuffizienz ebenfalls einen Einfluss. Die Bedeutung der STATs bei Herzerkrankungen zeigt sich unter anderem durch die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs bei myokardialer Ischämie (Omura et al., 2001). STAT3 wurde als Mediator von kardialer Hypertrophie und als Exekutor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors beschrieben (Kunisada et al., 1998; Funamoto et al., 2000). Des Weiteren wird STAT3 auch eine kardioprotektive Rolle zugesprochen (Kunisada et al., 2000; Negoro et al., 2001). Andere STAT-Isoformen, darunter STAT5 und STAT6, werden durch Angiotensin-II-Stimulation im Herzen aktiviert (Mascareno et al., 1998). STAT1 und STAT3 können Schutz über Präkonditionierung vermitteln (Hattori et al., 2001; Xuan et al., 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in ventrikulären Proben von explantierten humanen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) (n=9) alle STAT-Isoformen signifikant am kritischen Tyrosinrest phosphoryliert waren (Ng et al., 2002). In Patientenherzen mit ischämischer Herzerkrankung (n=11) waren STAT1 und STAT3 signifikant Tyrosin-phosphoryliert. Dabei war die STAT1-Y701-Phosphorylierung in DCM-Herzen 3,3-fach im Vergleich zu Kontroll-Donorherzen erhöht. Eine Phosphorylierung von Serin727 war ebenfalls in den Proben nachweisbar, zeigen aber keinen Unterschied zu den Kontroll-Donorherzen. Podewski et al. (2003) fanden dagegen in den Herzen einer Patientengruppe mit DCM im Endstadium (n=10) keinen Unterschied im Expressionsgrad von STAT1 und dem Phosphorylierungsniveau von Tyrosin701 im Vergleich mit Kontroll-Donorherzen.

Es war das Ziel dieser Arbeit, über die Herstellung von DNA-Bindemutanten einen besseren Einblick in die molekularen Mechanismen der Zielgenerkennung und -aktivierung von STAT1 zu gewinnen. Besonders interessant waren dabei solche STAT1-Mutanten, die über eine verstärkte Bindung an GAS-Stellen bzw. eine verbesserte kooperative DNA-Bindung bei jeweils erhaltener GAS-Sequenzerkennung verfügen. Diese Mutanten ließen sich tatsächlich identifizieren und erwiesen sich als überaus nützliche Werkzeuge zu einem systemischen Verständnis des STAT1-vermittelten Signalweges.

3 Material

3.1 Chemikalien

Sämtliche Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Loughborough, UK), Merck (Darmstadt), und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

3.2 Puffer, Lösungen und Medien

Sämtliche Puffer, Lösungen und Medien wurden mit entionisiertem Wasser aus der Millipore-Anlage Milli-Q (Millipore, Schwalbach) mit einem Molekulfiter der Porengröße 0,22 µm hergestellt und der pH-Wert gegebenenfalls mit dem pH-Meter Seven Easy (Mettler Toledo, Giessen) eingestellt. Bei Bedarf wurden die Lösungen autoklaviert oder über 0,2 µm-Filter steril filtriert.

3.3 Radiochemikalien

Die α -[^{32}P]-markierten Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurden mit spezifischen Aktivitäten von 3000 Ci/mmol bei Perkin Elmer (Rodgau) bezogen.

3.4 Antikörper

Der polyklonale STAT1-Antikörper C-24 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) wurde für die Western-Blot-Analysen 1:2000 und für die Immunfluoreszenz-Versuche 1:1000 mit Roti-Block verdünnt. Der Anti-Phospho-STAT1-(Tyr701)-Antikörper (Cell Signaling, Danvers, USA) wurde für Western-Blots in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen wurde polyklonales Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin aus Ziege (Dako, Glostrup, Dänemark) 1:1000 mit Roti-Block verdünnt. Als Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz-Versuche wurde Cy3-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) 1:500 mit 25% FBS in PBS verdünnt. Der polyklonale Anti-STAT3-Antikörper H-190 (Santa Cruz Biotechnology) wurde für Supershift-Reaktionen in EMSA-Experimenten verwendet.

3.5 Enzyme

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde von New England Biolabs (Schwalbach), AmpliTaq®-Gold-DNA-Polymerase von Applied Biosystems (Darmstadt), *DpnI*-Endonuklease und *PfuUltra*-HF-DNA-Polymerase von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Complete™-Mini Protease Inhibitoren stammen von Roche Applied Science (Mannheim), peqGold-DNase I von Peqlab (Erlangen) und T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (human, rekombinant, C-terminale 11 kDa-Deletion (TCΔC11, Reste 1-317), exprimiert in *E. coli*) von Biomol International (Plymouth, USA). Trypsin/EDTA-Lösung wurde bei PAA (Pasching, Österreich) erworben. DNase I wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.6 Reaktionskits

Die nachfolgend aufgelisteten Reaktionskits wurden nach Herstellerangaben verwendet:

ABsolute™-Blue-QPCR-SYBR®-Green- Mix	Thermo Scientific, Dreieich
AmpliTaQ® Gold-DNA-Polymerase,	
Puffer II, MgCl ₂ -Lösung	Applied Biosystems
Chromatin-Immunoprecipitation-(ChIP)-Assay-Kit	Millipore
Luciferase-Assay-System	Promega
peqGold-DNase-I-Digest-Kit	Peqlab
peqGold-Plasmid-Mini-prep-Kit	Peqlab
peqGold-total-RNA-Kit Safety-Line	Peqlab
QIAGEN Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid-Plus-Maxi-Kit	Qiagen
QuikChange®-II-Site-Directed Mutagenesis-Kit	Stratagene
Verso™-cDNA-Kit	Thermo Scientific
Western-Lightning®-Plus-ECL	Perkin Elmer

3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den Kapiteln über die Beschreibung einzelner Methoden angegeben. Alle anderen Verbrauchsmaterialien wurden von Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht),

Greiner (Finkenhausen), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Schleicher & Schuell (Dassel), Bio-Rad (Brüssel, Belgien), Nunc (Roskilde, Dänemark), Peqlab (Erlangen), Thermo-Fisher (Dreieich), Biometra (Göttingen) und VWR (Darmstadt) bezogen.

3.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Expressionsvektoren sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 2: Plasmide und Expressionsvektoren.

Plasmid	Beschreibung	Hersteller (Referenz)
pEGFP-N1	Plasmid-Vektor mit GFP	Clontech (Mountain View, USA)
pSTAT1 α -GFP ¹	Humanes STAT1 α (AS 1-747) in pEGFP-N1	(Begitt et al., 2000)
pSTAT1 α (E411A)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E411AF/E411AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (E411K)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E411KF/E411KR	diese Arbeit
pSTAT1 α (D92R)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar D92RF/D92RR	diese Arbeit
pSTAT1 α (E96R)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E96RF/E96RR	diese Arbeit
pSTAT1 α (E421K)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E421KF/E421KR	diese Arbeit
pSTAT1 α -NES-GFP ⁶	Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus STAT1, dem transferierbaren NES von STAT1 (AS 367-427) und GFP	Prof. Dr. U. Vinkemeier, Nottingham, UK
pSTAT1 α (E411A)-NES-GFP	Derivat von ⁶ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E411AF/E411AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (E411K)-NES-GFP	Derivat von ⁶ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E411KF/E411KR	diese Arbeit

pcDNA3.1	Plasmid-Vektor	Invitrogen
pcDNA3.1-STAT1 α ⁷	Humanes STAT1 α in pcDNA3.1	Dr. James E. Darnell, New York, USA
pcDNA3.1-STAT1 α (E411A)	Derivat von ⁷ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E411AF/E411AR	diese Arbeit
pcDNA3.1-STAT1 α (E411K)	Derivat von ⁷ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E411KF/E411KR	diese Arbeit
pcDNA3.1-STAT1 α - (D92R)	Derivat von ⁷ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar D92RF/D92RR	diese Arbeit
pcDNA3.1-STAT1 α (E96R)	Derivat von ⁷ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E96RF/E96RR	diese Arbeit
pcDNA3.1-STAT1 α (E421K)	Derivat von ⁷ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E421KF/E421KR	diese Arbeit
p β Gal	β -Galaktosidase-Expressionsvektor	Stratagene
pGAS3xLy6E	IFN γ -abhängiger Reportergenvektor	(Wen et al., 1995)
pIC-339	Reportergenvektor mit dem trunkierten Promoter des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P.T van der Saag, Utrecht, Niederlande
pIC-1352	Reportergenvektor mit dem Promoter des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P.T van der Saag, Utrecht, Niederlande

Da in dieser Arbeit nur Plasmide für STAT1 α benutzt wurden, wird zur weiteren Bezeichnung dieser Plasmide die Bezeichnung pSTAT1 verwendet. Der Zusatz -GFP zeigt die Verwendung des pSTAT1 α -GFP-Plasmids an, wenn dieser Zusatz nicht vorhanden ist, wurde der Vektor pcDNA3.1-STAT1 α unter dem Akronym pSTAT1 verwendet.

3.9 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei den Firmen Invitrogen oder TibMolBiol (Berlin) bestellt. Zur Konzeption von Primern wurde das Softwareprogramm Primer3 verwendet.

Primer für die Sequenz-spezifische Mutagenese:

Sequenz	Bezeichnung
5'-gcaagcgtaatcttcagcgtaattttcaggaagaccc-3'	D92R F
5'-gggtcttctgaaaattacgctgaagattacgcttgc-3'	D92R R
5'-cttcaggataatcttcagcgagacccaatccagatgtc-3'	E96R F
5'-gacatctggattgggtctcgcgtgaaaattatcctgaag-3'	E96R R
5'-cggcacctgcaattgaaagcacagaaaaatgctggcacc-3'	E411A F
5'-ggtgccagcattttctgtgctttcaattgcaggtgccg-3'	E411A R
5'-cggcacctgcaattgaaaaaacagaaaaatgctggcacc-3'	E411K F
5'-ggtgccagcattttctgtttttcaattgcaggtgccg-3'	E411K R

Sequenzierprimer:

Sequenz	Beschreibung
3'-tctgcaaggtttgcatttg -5'	171r
3'-tgaactggaccctgtcttc -5'	335r
3'-ctccacccatgtgaatgtga -5'	611r
5'-ttcagagctcgtttgtggtg -3'	312f
5'-ccttcttctgactccacca -3'	484f
5'-catcagcaaggagcgagag-3'	580f

Oligonukleotide als Sonde für Gelretardations-Experimente:

Sequenz	Beschreibung
5'-acgtcgacatttcccgtaaactcg -3'	M67 5'-3'
3'-cagtcagatttacgggaaatgtcg-5'	M67 3'-5'
5'-acggcgtttccccgaaattgacggatttaccccaac -3'	GAS-nonGAS 5'-3'
3'-caggggtggggtaaattccgtcaatttcggggaaacg -5'	GAS-nonGAS 3'-5'
5'-acggcgtttaccccaattgacggatttaccccaac -3'	2xnonGAS 5'-3'
3'-caggggtggggtaaattccgtcaatttcggggtaaacg-5'	2xnonGAS 3'-5'
5'-aagtcgtttccccgaaattgacggatttccccgaaac-3'	2xGAS 5'-3'
3'-caaaggggctttaactgcctaaaggggctttgctgaa-5'	2xGAS 3'-5'

Primer für RT-PCR:

Sequenz	Beschreibung
5'-agctcagctgtgcgagtgtga-3'	hIRF1f

5'-tagctgctgtggatcatcagg-3'	hIRF1r
5'-ccaccgagatccttatcgaa-3'	hMIG1f
5'-ctaaccgacttggctgcttc-3'	hMIG1r
5'-gggccagttgctgaaagagc-3'	hGBP1f
5'-tgacaggaaggctctggtct-3'	hGBP1r
5'-gaaggtgaaggtcggagtc-3'	hGAPDHf
5'-gaagatggtgatgggatttc-3'	hGAPDHr
5'-cctttcatgacctctgt-3'	hSTAT1f
5'-tgaatattccccgactgagc-3'	hSTAT1r

Primer für IRF1 (PCR bei CHIP-Assay):

Sequenz	Beschreibung
5'-cttcgccgctagctctacaacag-3'	ChIP IRF1f
5'-gctccgggtggcctcggttcg-3'	ChIP IRF1r

Primer für die SSCP-Analyse:

Sequenz	Beschreibung	Bezeichnung
5'-acgctgccaatgatgtttc-3'	Exon 4, AS 43-91	4f
5'-caggtcatacctgaagattacgc-3'	Exon 4, AS 43-91	4r
5'-aaccagcaagtacacaccctg-3'	Exon 6, AS 125-154	6f
5'-acaccccaagcaattgaaac-3'	Exon 6, AS 125-154	6r
5'-aaacgttaataggaattggc-3'	Exon 12, AS 347-366	12f
5'-tctgcttatttagtgagggaatctg-3'	Exon 12, AS 347-366	12r
5'-ttttcagcatttcttctatattgt-3'	Exon 14 377-407	14f
5'-aagggctgctctattgtcaaa-3'	Exon 14 377-407	14r
5'-tgttgcaatgttaattgggc-3'	Exon 15, AS 408-421	15f
5'-accaactgacctgtccttgc-3'	Exon 15, AS 408-421	15r
5'-tgttgcaatgttaattgggc-3'	Exon 16, AS 422-430	16f
5'-aaatacctccagaacaaactgag-3'	Exon 16, AS 422-430	16r

3.10 Bakterienstämme und Medien

E.coli DH5α (Stratagene)

Genotyp: *F-φ80dlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44 λthi-1 gyrA96 relA1*

E.coli XL1-Blue (Stratagene)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

LB-Medium:	LB-Agar:	SOC-Medium:
1% Trypton	1% Trypton	2% Trypton
0,5% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt
1% NaCl	1% NaCl	10 mM NaCl
pH 7,0	1,5% Agar Agar	2,5 mM KCl
	pH 7,0	20 mM MgSO ₄
		pH 7,5

Die Medien wurden bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Dem SOC-Medium wurde anschließend 20 mM steril filtrierte Glucose zugegeben.

Als Selektionsmarker wurden dem LB-Medium und LB-Agar nach dem Autoklavieren Kanamycin (50 µg/mL) oder Ampicillin (100 µg/mL) zugegeben.

3.11 Eukaryontische Zelllinien

HeLa-S3 Humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms
von Prof. Dr. U. Vinkemeier zur Verfügung gestellt

U3R STAT1-defiziente Zelllinie entstanden aus 2fTGH mit rekombinantem
IFN γ -Rezeptor
von Prof. Dr. U. Vinkemeier zur Verfügung gestellt

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Kultivierung und Behandlung von Säuger-Zellen

HeLa-S3- und U3R-Zellen wurden bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ in 250 mL Zellkulturflaschen kultiviert. Das Vollmedium der HeLa-S3-Zellen bestand aus Quantum 101 Hela-Medium (PAA, Pasching, Österreich) mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA), das der U3R-Zellen aus Dulbeccos-modifiziertem Eagles-Medium (DMEM) (Biochrom) mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) (Biochrom), 1% Penicillin/Streptomycin und 0,04 µg/mL Puromycin.

Zellpassage

Das Passagieren der Zellen erfolgte jeden zweiten oder dritten Tag durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,2 g/L EDTA, bezogen von Gibco, Eggenstein) nach einmaligem Waschen mit PBS (Gibco) und anschließender Aufnahme in Vollmedium. Die Zellen wurden 1:4 – 1:6 verdünnt ausplattiert.

Einfrieren von Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen trypsiniert, in PBS aufgenommen und für 10 Min. bei 1000 rpm und 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet einer 250 mL Kulturflasche wurde in 1 mL Einfriermedium (DMEM mit 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in Gefriergefäßen über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Nalgene, Heidelberg) auf -80°C abgekühlt. Die Zellen wurden bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit Vollmedium vorsichtig gemischt und für 10 Min. bei 1000 rpm und 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 12 mL Vollmedium resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen.

Transfektion von Säuger-Zellen

Für den Transfer von Plasmid-DNA in die humanen Zelllinien HeLa-S3 und U3R wurde das Transfektionsreagenz MegaTran 1.0 (Origene, Rockville, USA) verwendet. Für die Transfektion in 6-Loch-Platten wurde pro Loch 1,6 µg Plasmid-DNA, für ein Loch einer 48-Loch-Platte 0,25 µg DNA und pro Kammer eines 8-Kammer-Objektkträgers 0,1 µg DNA eingesetzt. Zu der Plasmid-DNA wurde pro 1 µg DNA 100 µL einer 150 mM NaCl-Lösung zugegeben und vorsichtig gevortext. Zu einem Teil Plasmid-DNA wurden drei Teile MegaTran 1.0 gegeben, 10 Sek. gevortext, anschließend 10 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. 24 bis 48 h nach Transfektion wurden die Zellen analysiert.

Behandlung von Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren

Wenn nicht anders angegeben, wurde für eine IFN γ -Stimulation 5 ng/mL humanes, rekombinantes IFN γ (Biomol, Hamburg), für die Staurosporin-Behandlung 1 µM Staurosporin und für die Leptomycin-B-Behandlung 10 µg/mL Leptomycin B (LMB) (LC Laboratories, Woburn, USA) eingesetzt.

4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte photometrisch mit einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die DNA wurde 1:50 mit H₂O verdünnt, eine OD₂₆₀ entsprach 50 µg/mL DNA. Die Formel zur Berechnung lautet:

$$\text{DNA-Konz. (}\mu\text{g/mL)} = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Verunreinigungen konnten durch Bestimmung des Quotienten der Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm A_{260}/A_{280} nachgewiesen werden, bei nicht kontaminierten DNA-Lösungen hatte der Quotient einen Wert von 1,8.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der Reaktionsansatz für die Detektion der Promotorfragmente im ChIP-Assay enthielt in 25 µL 1x-Puffer-II (Applied Biosystems), 5 µL DNA, 1,25 µL DMSO, 7,5 pmol eines

jeden der beiden DNA-Primer, 2,5 nmol eines jeden der vier natürlich vorkommenden Desoxynukleotide (Applied Biosystems), 0,05 μmol MgCl_2 und 0,65 Einheiten AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm des PCR-Automaten GeneAmp-PCR-System-2400 (Perkin Elmer) wurde wie folgt programmiert: nach einer 30-sekündigen Denaturierung bei 94°C wurden 37 Zyklen bestehend aus 30 Sek. Denaturierung bei 94°C, 30 Sek. Hybridisierung bei 55°C und 30 Sek. Elongation bei 72°C durchgeführt. Nach einer finalen 7-minütigen Elongation wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung in der Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese bei 4°C aufbewahrt. Der PCR-Ansatz für die SSCP-Analysen enthielt in 25 μL Ansatzgröße 2,5 μL von 10x Puffer II (Applied Biosystems), 1 μL DNA, 7,5 pmol eines jeden der beiden DNA-Primer, 2,5 nmol eines jeden der vier natürlich vorkommenden Desoxynukleotide (Applied Biosystems), 0,05 μmol MgCl_2 und 0,65 Einheiten AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase. Als Temperaturprogramm wurde eine Touch-Down-PCR gewählt, welche mit einem Enzymaktivierungsschritt bei 95°C für 10 Min. 30 Sek. begann. Das verwendete PCR-Profil ist in **Tab. 3** gezeigt.

Tab. 3: Temperaturprogramm der Touch-Down-PCR.

Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
3	30 Sek. 95°C	30 Sek. 68°C	45 Sek. 72°C
3	30 Sek. 95°C	30 Sek. 65°C	45 Sek. 72°C
4	30 Sek. 95°C	30 Sek. 63°C	45 Sek. 72°C
6	30 Sek. 95°C	30 Sek. 61°C	45 Sek. 72°C
6	30 Sek. 95°C	30 Sek. 58°C	45 Sek. 72°C
15	30 Sek. 95°C	30 Sek. 55°C	45 Sek. 72°C

Nach dem letzten Zyklus folgte eine 7-minütige Elongation bei 72°C, nach Abkühlen auf 4°C wurden die Proben dann in Probenpuffer (5Prime, Gaithersburg, USA) aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

4.4 DNA-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten aus dem ChIP-Assay erfolgte in 1,5%-igen Agarosegelen mit 0,3 $\mu\text{g/mL}$ Ethidiumbromid in Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE). Die DNA-Proben wurden mit Auftragspuffer (5Prime) versetzt und die Elektro-

phorese in 0,5x-TBE-Laufpuffer, hergestellt aus 10xTBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)), bei einer angelegten Spannung von 120 V in einer horizontalen Gelkammer (Biozym) durchgeführt. Die Agarosegele wurden mit UltraPure-Agarose (Invitrogen) hergestellt, als Molekulargewichts-Standard diente ein 100 bp DNA-Marker (Roche). Die DNA-Banden wurden im UV-Licht der ChemiDoc-Dokumentationskammer (Bio-Rad) detektiert und mit dem Programm Quantity One (Bio-Rad) ausgewertet.

4.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 50 mL LB-Medium mit 500 µL einer Übernachtskultur von *E.coli* DH5α angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 kultiviert. Die Bakterienkultur wurde 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 5 mL eiskaltem TSS-Puffer (10% PEG 8000, 5% DMSO, 30 mM MgCl₂, 1x LB) resuspendiert und in 100 µL-Aliquots bei -80°C eingefroren und gelagert.

4.6 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

100 µL kompetente *E.coli* DH5α-Bakterien bzw. 50 µL *E.coli* XL1-Blue superkompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und 10 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µL des Mutagenese-Ansatzes zugegeben und 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-sekündige Inkubation der *E.coli* DH5α-Bakterien und eine 45-sekündige der *E.coli* XL1-Blue-Bakterien bei 42°C gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Nach Kultivierung der Bakterien in 1 mL, bzw. 500 µL für den Mutageneseansatz, SOC-Medium auf einem Schüttler bei 225 rpm und 37°C für 1 h wurden 250 µL der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

4 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 225 rpm und 37°C inkubiert. 2 mL der Bakterienkultur wurden in ein 2 mL-Reaktionsgefäß

überführt und für 5 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung des peqGold-Plasmid-Mini-Prep-Kits nach Herstellerangaben isoliert und zur Sequenzierung verwendet. Für präparative Ansätze zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden 150 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie oder mit 1 mL einer 2 mL Übertagkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 6000 g für 15 Min. zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Pellet nach den Arbeitsanweisungen des QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kits oder QIAGEN-Plasmid-Plus-Maxi-Kits isoliert. Die mit Wasser eluierte Plasmid-DNA wurde nach Konzentrationsbestimmung auf 1 µg/mL verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.8 Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung erfolgte über Microcon-Ultracel-YM-30-Filter (Millipore). Dazu wurde das PCR-Produkt mit 480 µL H₂O auf den Filter gegeben und für 12 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und nach Zugabe von 480 µL H₂O nochmals für 12 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 15 µL H₂O wurde auf der Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert, der Filter umgedreht und für 4 Min. bei 13.000 rpm eluiert.

4.9 Einführung von Punktmutationen in Plasmide

Punktmutationen in STAT1-kodierende Plasmide wurden unter Verwendung des QuikChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kits eingeführt. Die Reaktion verlief in 50 µL-Ansätzen ausgehend von 25 ng der Matrizen-DNA und je 125 ng der beiden komplementären Mutagenese-Primer unter Katalyse von 2,5 Einheiten PfuUltra-HF-DNA-Polymerase in Gegenwart von 1 µL dNTP-Mix, bestehend aus den vier natürlich vorkommenden Desoxynukleotiden (dNTP). Das Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestand aus einem initialen 30-sekündigem Denaturierungsschritt bei 95°C und 16 repetitiven Zyklen einer 30 Sek. dauernden Denaturierung bei 95°C, gefolgt von einem Hybridisierungsschritt bei 55°C über 1 Min. und einer Synthesephase von 14 Min. bei 68°C. Die methylierte DNA-Matrize wurde in einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C durch 10 Einheiten *Dpn*-I-Endonuklease degradiert. Die unmethylierte Doppelstrang-DNA mit den eingeführten Punktmutationen wurde

anschließend zur Zirkularisierung in XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert (siehe Kapitel Transformation von DNA in kompetente Bakterien).

4.10 DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit eingeführten Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Dazu wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol Sequenzierprimer gemischt, mit H₂O auf 7 µL aufgefüllt und die Proben zur Sequenzierung an SeqLab-Sequence-Laboratories (Göttingen) geschickt.

4.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Wenn nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Lösungen dem Chromatin-Immunoprecipitation-(ChIP)-Assay-Kit (Millipore) entnommen. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden U3R-Zellen in 250 mL Kulturflaschen kultiviert und mit pSTAT1-WT oder pSTAT1-E411A transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Vollmedium gegen ein 1% FBS-haltiges Medium ausgetauscht. Nach weiteren 15 h wurde entweder für 30 Min. mit IFN γ stimuliert, für 30 Min. mit IFN γ und anschließend für 30 Min. mit Staurosporin inkubiert oder die Zellen wurden unstimuliert belassen. Zur Quervernetzung der Proteine mit DNA wurde zu dem Medium Formaldehyd in einer finalen Konzentration von 1% gegeben und die Zellkulturflasche für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 0,4 mM Pefabloc enthaltendem, PBS-Puffer gewaschen. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst und bei 2000 rpm für 4 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µL ChIP-Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Um die DNA in eine immunpräzipitierbare Größe zwischen 200 und 1000 bp zu bringen, wurde das Lysat mit 50 mg Glas-Beads versetzt und fünfmal für 5 Sek. auf Eis mit Ultraschall behandelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 Min bei 12.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde 10-fach mit ChIP-Dilution-Puffer, komplettiert mit Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 0,4 mM Pefabloc, verdünnt und mit 75 µL Protein-A-Agarose/Lachssperm-DNA (50% Slurry) zugegeben. Das Gemisch wurde 30 Min. bei 4°C auf einem Schüttelrad inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 Min. bei 1000 rpm und 4°C wurden zu dem Überstand 4 µL Antikörper C-24 zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttelrad

inkubiert. Nach Zugabe von 60 μL Protein-A-Agarose/Lachssperm-DNA (50% Slurry) wurde für 1 h bei 4°C auf dem Schüttelrad inkubiert und danach die Agarose für 1 Min. bei 1000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nach Arbeitsanweisung des Chromatin-Immunoprecipitation-(ChIP)-Assay-Kits mit Low-Salt-Immune-Complex-Wash-Puffer, High-Salt-Immune-Complex-Wash-Puffer, LiCl-Immune-Complex-Wash-Puffer und TE-Puffer gewaschen. Die Protein-DNA-Komplexe wurden mit 250 μL frisch angesetzttem Elutions-Puffer (1% SDS, 0,1 M NaHCO_3) vorsichtig gevortex und für 15 Min. bei Raumtemperatur auf einem Schüttelrad inkubiert. Nach Pelletieren der Agarose für 1 Min. bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen. Die Elution wurde wiederholt und die Überstände vereinigt. Nach Zugabe von 20 μL einer 5 M NaCl-Lösung wurde die DNA-Protein-Quervernetzung durch 4-stündige Inkubation bei 65°C aufgehoben, gefolgt von einem Proteinase-K-Verdau nach Herstellerangaben für 1 h bei 45°C. Die DNA wurde nachfolgend durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und in H_2O aufgenommen. Die Detektion der Promotorfragmente erfolgte mittels PCR und DNA-Agarose-Gelelektrophorese.

4.12 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)

Die SSCP-Analyse ist eine Methode, um Mutationen innerhalb vorgegebener Genabschnitte aufzufinden (Orita et al., 1989). Dazu werden die PCR-Amplifikate genomischer DNA nach Denaturierung in DNA-Einzelstränge auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Einzelstrang-DNA neigt zur Rückfaltung und zur Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen, die ihre Stabilität durch schwache intramolekulare Wechselwirkungen erhalten. Die elektrophoretische Mobilität der DNA-Fragmente hängt sowohl von der Länge der Molekülkette als auch von der Sekundärstruktur ab. Letztere ist durch die DNA-Sequenz bedingt, daher zeigt ein Einzelstrang mit abweichender Basenfolge eine andere Struktur und Wanderungsgeschwindigkeit bei der Gelelektrophorese und somit ein verändertes Bandenmuster. Die 25 μL PCR-Ansätze wurden mit der gleichen Menge an denaturierendem Probenpuffer (95% Formamid, 10 mM Natriumhydroxid (NaOH), 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol) versetzt und für 5 Min. auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 8%-igen Polyacrylamidgelen (1x TBE, 1% Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED);

17x18 cm) für 4 h bei 4°C und 300 V in einer Maxige Ikkammer (Biometra). Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele für 3 Min. in eine 1%-ige wässrige Ethidiumbromidlösung gelegt und danach für 3 Min. in ein Wasserbad. Die DNA-Banden wurden im UV-Licht des ChemiDoc-Geldokumentationsgerätes detektiert und mit dem Programm Quantity One ausgewertet. Im Falle eines Bandenshift wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und mittels modifizierter Didesoxymethode sequenziert.

4.13 RNA-Isolation

U3R-Zellen wurden in 6-Loch-Multischalen kultiviert und mit den jeweiligen STAT1-Expressionsplasmiden im Vektor pcDNA3.1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht in einem 1% FBS enthaltenden Medium kultiviert und dann entweder 6 h bei 37°C mit IFN γ im Vollmedium stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Absaugen des Mediums erfolgte die RNA-Isolation nach den Herstellerangaben des peqGold-Total-RNA-Kits. Zusätzlich erfolgte ein DNase-Verdau nach Herstellerangaben mit dem peqGold-DNase-I-Digest-Kit. Die RNA wurde mit 50 μ L RNase-freiem Wasser eluiert und entweder direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

4.14 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription der RNA zur komplementären DNA (cDNA) wurde das Verso-cDNA-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Dieses System enthält die Verso-Reverse-Transcriptase und als Primer wurden die Anchored-oligo-dT-Primer verwendet. Für einen 20 μ L-Ansatz wurden 8 μ L RNA eingesetzt. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

4.15 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 μ L nach den Herstellerangaben des Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green-Mix-Kits durchgeführt. Pro Reaktion wurde 1 μ L cDNA eingesetzt, es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen. Zur Enzymaktivierung wurde für 15 Min. auf 95°C erhitzt, danach folgten 45 Zyklen mit 15 Sek. Denaturierung bei 95°C, Hybridisierung für 30 Sek. bei 55°C

und Verlängerung für 30 Sek. bei 72°C. Am Ende wurde eine Schmelzkurve zur Reinheitsbestimmung der PCR-Produkte aufgenommen. Als Real-Time-Cycler wurden die Geräte iCycler-iQ5 (Bio-Rad) mit der Software iQ5 (Bio-Rad) und der Mastercycler-ep-realplex² (Eppendorf) mit der Software Realplex (Eppendorf) verwendet. Die Auswertung und Dokumentation der Daten erfolgte mit den Softwareprogrammen Excel (Microsoft, Unterschleißheim), SigmaPlot (Systat Software, Erkrath) und CorelDraw (Corel, Unterschleißheim). Als Auswerteverfahren wurde die Delta-Delta-Ct-Methode verwendet (Pfaffl, 2001).

4.16 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden Zellen auf LabTek-Chamber-Slides mit acht Kammern kultiviert und transfiziert. Zellen, die GFP-markiertes STAT1 exprimierten wurden 16-24 h nach Transfektion, wie jeweils angegeben, stimuliert und anschließend 15 Min. bei RT mit Roti-Histofix 4% fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 Min. bei RT unter Schütteln mit Hoechst 33258 (5 µg/mL in PBS) gefärbt und erneut mit PBS und H₂O gewaschen. Danach wurden die Objektträger mit Fluoromount-G-Eindeckmedium (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckt.

Für die immunocytochemische Detektion von unmarkiertem STAT1 wurden die Zellen 16-24 h nach Transfektion wie jeweils angegeben stimuliert und für 10 Min. in kaltem Methanol bei -20°C fixiert. Durch 20-minütige Behandlung bei RT mit 1% Triton-X-100 in PBS wurden die Zellen permeabilisiert und anschließend für 45 Min. mit 25% FBS in PBS zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Danach erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-STAT1 C-24 in einer 1:1000 Verdünnung mit 25% FBS in PBS unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation für 45 Min. mit Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege in 500-facher Verdünnung (25% FBS in PBS) unter Schütteln. Es folgten drei Waschschrte mit PBS, eine anschließende Hoechst-Färbung und die Eindeckung der Präparate.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden mit dem Mikroskop DM5000B (Leica, Wetzlar) analysiert. Mit einer CCD-Kamera wurden von den Proben fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und mittels der QWin-Software (Leica) bearbeitet. Aufnahmen von GFP-gekoppelten Fusionsproteinen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm, von Cy3-gekoppelten Antikörpern bei 550 nm und

von Hoechst-gefärbten Zellkernen bei 280 nm angefertigt. Die weitere Bearbeitung und Dokumentation der digitalen Daten erfolgte mit dem Grafikprogramm CorelDraw (Corel).

4.17 Digitonisierung

HeLa-S3-Zellen wurden mit STAT1-kodierenden Plasmiden transfiziert und 16-24 h später mit IFN γ für 45 Min. stimuliert. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit 50 μ g/mL Digitonin (Roche) in Transportpuffer (0,2% Triton-X-100, 10 mM Kaliumchlorid (KCl), 1,5 mM MgCl $_2$, 10 mM Hepes, pH 7,4; unmittelbar vor dem Versuch wurden 1 mM Dithiothreitol (DTT) und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugesetzt) für 6 Min. auf Eis permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 15 Min. mit 4%-Formaldehyd in PBS bei RT fixiert und im Anschluss einer Hoechst-Färbung unterworfen. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

4.18 Herstellung von Zellextrakten

Gesamtzellextrakte wurden für Western-Blot-Analysen, *In-vitro*-Dephosphorylierungsversuche und EMSA-Experimente eingesetzt. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden HeLa-S3- oder U3R-Zellen in 6-Loch-Platten 16-24 h nach Transfektion wie jeweils angegeben stimuliert, mit PBS gewaschen und pro Loch mit 35 μ L cytosolischem Extraktionspuffer (10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 20 mM Hepes, 1 mM Natrium-ortho-Vanadat (Na $_3$ VO $_4$), pH 7,4) lysiert. Dem Puffer wurden unmittelbar vor dem Gebrauch 0,1% IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 0,4 mM Pefabloc frisch zugesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, die Lysate in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 10 Sek. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, für 5 Min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und die cytosolischen Extrakte entweder 1:1 mit den jeweiligen nukleären Extrakten gemischt oder getrennt analysiert.

Die Niederschläge der Zentrifugation wurden in 35 μ L nukleärem Extraktionspuffer (420 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% Glycerol, 20 mM Hepes, 0,1 mM Na $_3$ VO $_4$, pH 7,4) resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Dem nukleären Extraktionspuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch 3 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und

0,4 mM Pefabloc frisch zugesetzt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurden die nukleären Extrakte entweder 1:1 mit den cytosolischen Extrakten gemischt oder separat analysiert. Für Western-Blot-Analysen wurden die vereinigten Extrakte mit 6xSDS-Probenpuffer (8% Natriumlaurylsulfat (SDS), 350 mM Tris-HCl, 30% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt, für 3 Min. bei 95°C erhitzt und die Proben bei -20°C aufbewahrt. Für EMSA- und Dephosphorylierungsversuche wurden die Extrakte ohne Zugabe von Probenpuffer bei -80°C gelagert.

4.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; dieses System ist eine modifizierte Version des von Laemmli (1970) beschriebenen Verfahrens. Die Größe der Gele betrug 80 x 80 x 1 mm (Länge x Breite x Tiefe); es wurden die vertikalen Gelelektrophoresesysteme Mini-Twin (Biometra) verwendet. Zum Gießen der 10%-igen Gele wurde Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung) mit 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8) verdünnt und 0,03% APS sowie 0,16% TEMED kurz vor dem Gießen zugegeben. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aus 5% Acrylamid (Rotiphorese Gel 30) in 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8), 0,06% APS und 0,2% TEMED über dieses gegossen und der Auftragskamm eingesetzt. Die bei -20°C gelagerten Proben wurden erneut für 3 Min. bei 95°C erhitzt und pro Auftragskamm 10-18 μ L aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,6) bei einer Stromstärke von 11 mA pro Gel.

4.20 Western-Blot und immunchemische Proteindetektion

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Elektrotransfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran im Halb-Trocken-Blot-Verfahren nach Eckerskorn et al. (1988). Für das Elektroblothing wurde die PerfectBlue-Semi-Dry-SEDEC-M-Blotapparatur (PeqLab) verwendet. Die PVDF-Membran (Millipore) wurde 5 Min. in Methanol hydrophilisiert, um eine vollständige Benetzung der Membran mit Puffer zu ermöglichen. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen für je 5 min in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,0). Das zu

blottende Gel wurde nach der Elektrophorese aus der Apparatur genommen und in H₂O gespült. Auf die Anodenplatte wurden nacheinander zwei Filterpapiere, getränkt in Transferpuffer, die PVDF-Membran, das Gel und abschließend zwei in Transferpuffer getränkte Blotfilterpapiere im sogenannten Sandwich-Verfahren gelegt. Luftblasen wurden durch Abrollen mit einer serologischen Pipette entfernt, die Kathodenplatte aufgesetzt und festgedreht. Die Transferzeit betrug 1,5 h bei 80 mA/Gel und Raumtemperatur. Um unspezifische Bindungsstellen der Membranen nach dem Blotten abzusättigen, wurden diese für 1 h bei RT unter Schütteln mit Roti-Block inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem in Roti-Block 1:1000 verdünnten primären Anti-Phospho-STAT1-Antikörper bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurden die Membranen nach 5x Waschen für je 5 Min. in PBS-T (1,5 M NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂HPO₄, 30 mM KCl, pH 7,4 mit 0,1% Tween20) mit polyklonalem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (1:1000 Verdünnung in Roti-Block) 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem 5-minütigen Waschen mit PBS-T wurden die Membranen mit H₂O gespült und mit Hilfe des Western-Lightning-Chemiluminescence-Reagent-Plus-Kits (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers entwickelt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden Autoradiographiefilme (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit den Membranen exponiert und mit Hilfe des Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

Für die erneute Analyse mit einem anderen Erstantikörper wurden die gebundenen Antikörper durch Inkubation für 60 Min. bei 60°C unter Schütteln in Ablösepuffer (2% SDS, 0,7% β -Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) inkubiert. Nach viermaligem Waschen in PBS-T für je 15 Min. konnte danach erneut mit Blockierlösung und den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden. Als Erstantikörper wurde der polyklonale Anti-STAT1-Antikörper C-24 (verdünnt in Roti-Block 1:2000) verwendet.

4.21 Gelshift-Assays

Zum Nachweis der spezifischen DNA-Bindung von STAT1 wurden EMSA (Elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay)-Experimente durchgeführt (Begitt et al., 2000). Dazu wurden die Überhänge komplementärer Oligonukleotide mit singulärer (M67), zweifacher (2xGAS), einer singulären gefolgt von einer degenerierten GAS-Stelle (GAS-nonGAS) oder zwei aufeinander folgenden degenerierten GAS-Stellen (2xnonGAS) radioaktiv markiert. Die Denaturierung erfolgte für 5 Min. bei 95°C in

Oligo-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) gefolgt von einem langsamen Abkühlen auf RT bei einer Konzentration von 50 pmol/mL je Oligonukleotid. Die Überhänge der Oligonukleotide wurden mit radioaktiv markierten Nukleotiden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (New England Biolabs) aufgefüllt. Dazu wurden 0,1 ng doppelsträngige Oligonukleotide und je 8 µL der vier [³²P]-markierten Desoxynukleotiden (dNTP) mit 5 Einheiten Klenow-Enzym in 5 µL 10x Eco-Pol-Puffer (New England Biolabs) bei RT für 25 Min. inkubiert. Dann wurde 1 µL einer nicht-radioaktiven dNTP-Lösung (6,5 mM je dNTP) zugegeben und für 5 Min. bei RT inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µL 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt und freie Nukleotide wurden durch Zentrifugation über Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare) für 3 Min. bei 700 g und RT abgetrennt.

Eine EMSA-Reaktion enthielt 1 ng der radioaktiv markierten Sonde, 1 µL einer Poly-Desoxyinosid-Desoxycytidin-Lösung (Poly-dIdC, mittlere Länge ca. 800 bp) der Konzentration 2 mg/mL und 2,5 µL 5x Shift-Puffer (100 mM Hepes, pH 7,9, 20% Ficoll, 5 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0,5 mM 1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), 2,5 mM EDTA), 13 µL DTT (100 mM) und 4,5 µL Gesamtzellextrakt. Aufgefüllt wurde die Probe mit PBS oder mit untransfizierten U3R-Gesamtzellextrakten auf 13 µL. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde das denaturierende EMSA-Polyacrylamidgel beladen. Je nach Versuch wurden Kompetitionen mit nicht-radioaktiv markierter DNA durchgeführt. Dazu wurden zu dem Ansatz unmarkierte Oligos in 750-fachem Überschuss gegeben und bei RT inkubiert. Supershift-Reaktionen enthielten je Reaktionsansatz 1,3 µL einer 1:10 Verdünnung von polyklonalem STAT1-Antikörper C-24 oder STAT3-Antikörper H-190 in PBS.

Die Proben wurden in nativen, äquibrierten 4,8%-igen Polyacrylamid-Gelen bei 400 V und 4°C mit 0,25x TBE-Puffer für etwa 2,5 h aufgetrennt. Die Gele wurden aus einer Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)-Lösung (Rotiphorese Gel 40), 0,2% APS und 0,1% TEMED in 0,25x TBE hergestellt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für 2 h auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet und mindestens über Nacht bei RT auf Phospho-Imager-Folie exponiert. Gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe des Fujifilm-BAS-1000 (Fuji, Düsseldorf) detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm CorelDraw (Corel).

4.22 Reporter-gen-Assays

Um die Genaktivierung von STAT1-WT und den STAT1-Mutanten zu bestimmen, wurde ein Luciferase-kodierendes Reporter-genkonstrukt mit drei IFN γ -sensitiven Ly6E-STAT-Bindestellen (Wen et al., 1995) eingesetzt. Zusätzlich wurde zur Normalisierung ein konstitutiv exprimierter β -Galactosidase-Reporter in die Zellen kotransfiziert und die β -Galactosidaseaktivität in den gleichen Extrakten gemessen. U3R-Zellen wurden pro Loch einer 48er-Multischale mit 250 ng des entsprechenden STAT1-kodierenden Expressionsplasmids, 200 ng β -Galactosidase-Reporterplasmid und 70 ng 3xLy6E-Plasmid transfiziert. 16-24 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder für 6 h mit IFN γ im Vollmedium stimuliert oder nicht behandelt. Es wurden jeweils 6-fach Bestimmungen durchgeführt. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und pro Loch 100 μ L Triton-Glycylglycin-Lysepuffer (25 mM Glycylglycin, 1% Triton-X-100, 15 mM MgSO $_4$, 4 mM EGTA, pH 7,8) zugegeben. Unmittelbar vor der Zugabe wurden dem Puffer 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugegeben. Nach 15-minütiger Lyse bei RT wurden die Lysate in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 15 Min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 20 μ L der Überstände wurde in weiße 96er Immuno-Platten pipettiert und die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von 50 μ L Substratlösung des Luciferase-Assay-Systems in dem Luminometer Centro-LB-960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen. Zur Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität wurden 20 μ L des Lysats mit 211 μ L Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,2), 66 μ L o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), 4 mg/mL in 100 mM Natriumphosphat-Puffer, und 3 μ L einer 100x Magnesium-Lösung (100 mM MgCl $_2$, 4,5 mM β -Mercaptoethanol) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ca. 20 Min. durch Zugabe von 500 μ L einer 0,5 M Natriumcarbonat-Lösung (Na $_2$ CO $_3$) gestoppt und die β -Galactosidaseaktivität bei einer Wellenlänge von 420 nm durch Messen des Reaktionsproduktes der ONPG-Umsetzung mit dem Nicolet-Evolution-100-Photometer (Thermo, Dreieich) bestimmt. Zur Normierung wurde der Quotient aus dem Messwert der Luciferaseaktivität durch den Messwert der β -Galactosidaseaktivität gebildet. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden mit den Softwareprogrammen Excel und SigmaPlot berechnet.

4.23 Dephosphorylierungsassay

Für den *In-vitro*-Dephosphorylierungsassay wurden 10 µL Gesamtzellextrakt oder cytoplasmatischer Extrakt mit 10 µL Dephosphorylierungspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mg/mL Bovines Serumalbumin (BSA), 50 mM KCl, 5 mM EDTA) gemischt. Unmittelbar vor dem Versuch wurden dem Dephosphorylierungspuffer 20 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 2 Einheiten T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP) (Biomol International, Plymouth, USA) zugegeben. Die Proben wurden für 0-60 Min. bei 30°C inkubiert und danach mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und für 3 Min. auf 95°C erhitzt. Die Analyse erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot mit immunchemischer Proteindetektion. Gegebenenfalls erfolgte vor der Dephosphorylierung eine DNase-I-Inkubation für 30 Min. bei 37°C. Dazu wurde n zu 25 µL Extrakt 5 µL DNase I (2 U/µL) und 3 µL 10x Puffer (Invitrogen) gegeben.

Für die Bestimmung der *In-vivo*-Dephosphorylierung wurden HeLa-S3- oder U3R-Zellen in 6-Loch-Platten mit STAT1-kodierenden Plasmiden transfiziert und 16-24 h danach mit IFN γ stimuliert. Am Ende der Stimulationsphase wurde einmal mit PBS gewaschen und für unterschiedlich lange Zeiträume in Gegenwart von Staurosporin inkubiert. Danach wurden cytosolische und nukleäre Zellextrakte isoliert und gegebenenfalls gemischt. Das Ausmaß der Reaktion wurde mittels Western-Blot analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Sequenzhomologien in der DNA-Bindedomäne von STAT-Proteinen

Das Ziel dieser Arbeit war es, DNA-Bindemutanten von STAT1 mit modifizierter Affinität zu DNA bei erhaltener Erkennung von GAS-Stellen zu generieren, um den Einfluss von unterschiedlichem DNA-Bindevverhalten auf die transkriptionelle Aktivität zu untersuchen. Dazu wurden zunächst Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne eingeführt, wobei gezielt solche Aminosäurereste substituiert wurden, die bei Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie konserviert sind.

Tab. 4: Sequenzvergleich von homologen Bereichen in der DNA-Bindedomäne von humanen STAT-Proteinen.

Die Glutaminsäure an Position 411 von STAT1 ist bei vier der sechs STAT-Proteine konserviert.

STAT1	401	A	A	E	F	R	H	L	Q	L	K	E	Q	K	.	.	N	A	G	T	R	T	N	E
STAT2	397	I	W	D	F	G	Y	L	T	L	V	E	Q	R	S	G	G	S	G	K	G	S	N	K
STAT3	405	S	A	E	F	K	H	L	T	L	R	E	Q	R	C	G	N	G	G	R	A	N	C	D
STAT4	397	S	V	E	F	R	H	L	Q	P	K	E	M	K	S	.	S	A	G	G	K	G	N	E
STAT5a	414	S	A	H	F	R	N	M	S	L	K	R	I	K	.	.	.	R	A	D	R	.	.	R
STAT5b	414	S	A	H	F	R	N	M	S	L	K	R	I	K	.	.	.	R	S	D	R	.	.	R
STAT6	357	S	A	L	F	K	N	L	L	L	K	K	I	K	.	.	.	R	C	E	R	.	.	K

Mit Hilfe der Kristallstruktur von STAT1 (PDB-ID: 1BF5) wurde ein Glutaminrest in Position 411 identifiziert, dessen Carboxylatgruppe einen Abstand von 5,7 Å zu dem Phosphodiester-Rückgrat der kokristallisierten DNA-Doppelhelix besitzt. Durch Sequenzvergleich der humanen STAT-Familie wurde festgestellt, dass der Glutaminrest 411 in STAT1, STAT2, STAT3 und STAT4 konserviert ist (**Tab. 4**). Weiterhin wird aus der Kristallstruktur von STAT1 ersichtlich, dass kein anderer Aminosäurerest den freien Zugang dieses Glutaminsäurerestes zur DNA verstellt (**Abb. 3**). Diese Aminosäure wurde gegen Alanin bzw. Lysin ausgetauscht. Zusätzlich wurde in einer anderen Mutante an Position 421 eine Glutaminsäure durch Lysin ersetzt. Die endständige Carboxylatgruppe dieses Aminosäurerestes zeigt, wie man **Abb. 3** entnehmen kann, ebenfalls zur DNA und wurde bereits von Chen et al. (1998) als Interaktions-

partner der kleinen Furche der DNA beschrieben. In weiteren Experimenten wurde der Phänotyp dieser beiden Punktmutanten eingehend untersucht.

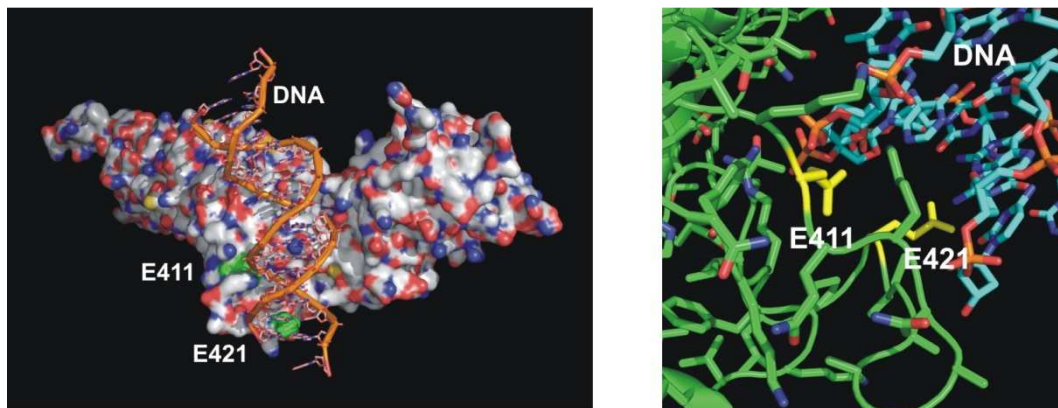


Abb. 3: Lokalisation zweier kritischer Glutaminsäurereste in der DNA-Bindedomäne von STAT1.

Gezeigt ist ein Teil der Kristallstruktur von trunkiertem STAT1, welches an DNA gebunden ist. Dabei sind die beiden Glutaminsäurereste an den Positionen 411 und 421 in grüner Farbe hervorgehoben. Das linke Bild zeigt eine Oberflächendarstellung eines an die DNA-Doppelhelix gebundenen, trunkierten Monomers, rechts davon ein Ausschnitt mit topographischer Beziehung beider Glutaminsäurereste (gelb) zur DNA. Die Abbildungen wurden mit dem Software-Programm PyMOL anhand des Protein-Data-Bank-(PDB)-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

5.2 Mutationen von zwei Glutaminsäure-Resten in der DNA-Bindedomäne führen zu einer Hyperphosphorylierung von STAT1

Tyrosin-Phosphorylierung, Dimerisierung und DNA-Bindung sind notwendige Voraussetzungen für die Zytokin-induzierte Kernakkumulation der STATs (Shuai et al., 1992; Darnell et al., 1994; Mowen und David, 1998; Herrington et al., 1999). Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Einzelmутanten STAT1-E411A und -E421K die Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung und der Kontaktierung von DNA verändern. Um die Zytokin-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung und Dephosphorylierungskinetik zu überprüfen, wurden Western-Blot-Versuche durchgeführt. Dabei wurde das Tyrosin-Phosphorylierungsniveau von in HeLa-S3-Zellen exprimierten STAT1-GFP-Fusionsproteinen nach Stimulation mit steigenden IFN γ -Konzentrationen in Western-Blot-Versuchen unter Verwendung von Phospho-STAT1-Antikörpern analysiert. Um sicherzustellen, dass in allen Extrakten vergleichbare STAT1-Mengen aufgetragen waren, wurde nach stringenter Abwaschen der Phospho-STAT1-Antikörper die gleiche Western-Blot-Membran mit STAT1-spezifischem Antikörper reinkubiert. In **Abb. 4** zeigte sich schon bei niedriger IFN γ -Konzentration ein deutlich erhöhtes

Phosphorylierungsniveau der Mutante E411A-GFP im Vergleich zu STAT1-WT-GFP. Bei STAT1-E421K-GFP fand sich dagegen kein Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierungsrate im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Daten nicht gezeigt).

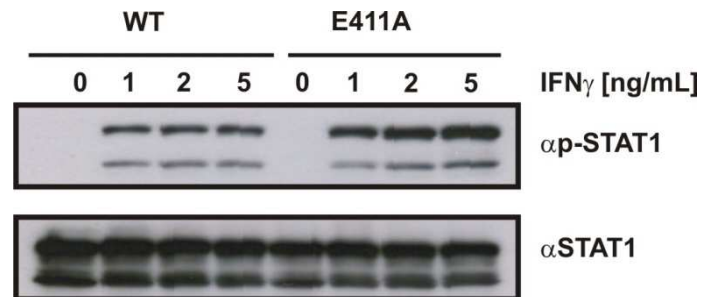


Abb. 4: Hyperphosphorylierung von STAT1-E411A in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen nach konzentrationsabhängiger IFN γ -Stimulation.

STAT1-WT-GFP bzw. STAT1-E411A-GFP exprimierende HeLa-S3 -Zellen wurden für 45 Min. wie angegeben mit steigenden Konzentrationen von IFN γ stimuliert, dann wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und diese in Western-Blot-Analysen untersucht. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist der Western-Blot nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt. Die jeweils oberen Banden zeigen die STAT1-GFP-Fusionsproteine, die unteren Banden markieren endogenes STAT1.

Wie in **Abb. 5A** und **5B** zu sehen, blieb die Hyperphosphorylierung der Punktmutante auch nach Behandlung mit Staurosporin, einem Inhibitor von Tyrosin-Kinasen (Shuai et al., 1992), bestehen. Bei STAT1-WT-GFP wurde schon nach 15-minütiger Staurosporin-Inkubation eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungsgrades beobachtet, STAT1-E411A-GFP dagegen zeigte eine deutlich verzögerte Dephosphorylierungsrate. Verstärkend kommt hinzu, dass das spezifische Phosphorylierungsniveau von E411A-GFP bezogen auf die Gesamtmenge von phosphoryliertem und unphosphorylierte STAT1 deutlich höher ist als bei den STAT1-WT-Extrakten. Dieses wurde als Bestätigung der Hyperphosphorylierung dieser Mutante gewertet. Die Punktmutante STAT1-E421K-GFP zeigte einen vergleichbaren Phänotyp bezüglich ihres Phosphorylierungsniveaus, allerdings war die Hyperphosphorylierung hier weniger prominent. Die Versuche zur *In-vivo*-Dephosphorylierungskinetik wurden sowohl in HeLa-S3- als auch in U3R-Zellen durchgeführt und ergaben in beiden Zelltypen eine verlängerte Phosphorylierung der STAT1-Mutanten mit partieller Staurosporin-Resistenz.

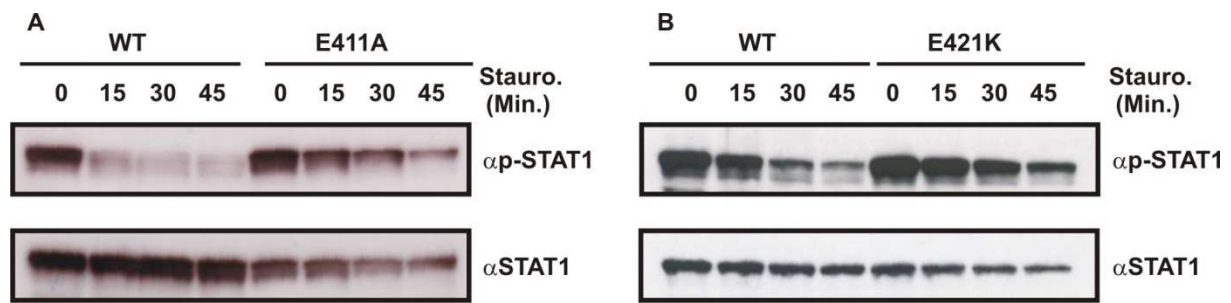


Abb. 5: *In-vivo*-Dephosphorylierungsassays bestätigen die Hyperphosphorylierung von STAT1-E411A und -E421K.

(A) STAT1-WT-GFP und STAT1-E411A-GFP exprimierende U3R-Zellen wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und diese in Western-Blot-Analysen untersucht. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörpern. Im unteren Feld ist dieselbe Blot-Membran nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt. (B) STAT1-WT-GFP und STAT1-E421K-GFP exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Minuten mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und danach für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Western-Blots mit einem polyklonalen Anti-Phosphotyrosin-STAT1-Antikörper (oben) und nach Reinkubation derselben Blot-Membran mit einem Pan-STAT1-Antikörper (unten).

Um die DNA-Bindung der Punktmutanten zu untersuchen, wurden Gelretardations-Experimente (EMSA) mit einer [32 P]-markierten, hoch-affinen DNA-Sonde bestehend aus einer einfachen GAS-Bindestelle (M67) durchgeführt. Wie in **Abb. 6A** und **6B** zu sehen, konnte in Gesamtzellextrakten transfizierter U3R-Zellen für alle untersuchten STAT1-Mutanten eine Bindung der GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A und -E421K an M67 demonstriert werden. Für diese Versuche wurden die Zellen für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und anschließend mit Staurosporin für die angegebenen Zeiten inkubiert (**Abb. 6A**). In **Abb. 6B** wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und, wie angegeben, mit Staurosporin behandelt. Die Verschiebung der Bande bei Zugabe eines STAT1-spezifischen Antikörpers beweist die Identität der Bande als STAT1-DNA-Komplex (α S1). Als Negativkontrolle wurde zu einer Probe ein STAT3-spezifischer Antikörper zugegeben (α S3), bei dem die Supershiftreaktion, anders als bei der Zugabe von Anti-STAT1-Antikörper, zu keiner Änderung im Laufverhalten der STAT1-DNA-Komplexe führte. Es wurden vergleichbare Extraktmengen in den EMSA-Analysen eingesetzt.

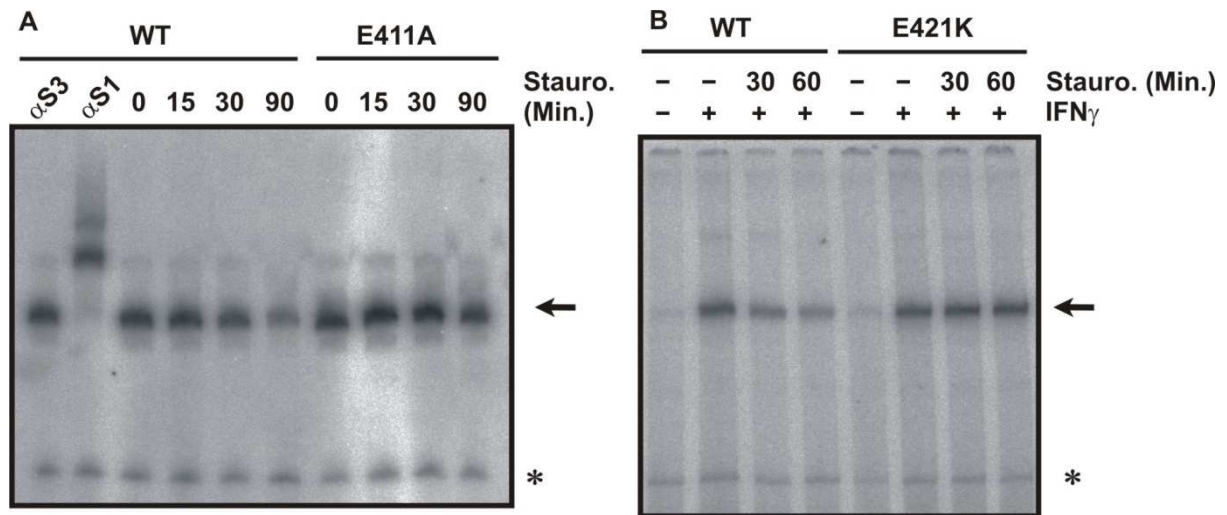


Abb. 6: Nachweis der verlängerten DNA-Bindung von STAT1-E411A-GFP und STAT1-E421K-GFP im Gelretardations-Experiment.

(A) STAT1-WT und STAT1-E411A exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Gesamtzellextrakte wurden isoliert, mit einer [32 P]-markierten M67-Sonde equilibriert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. $\alpha S3$ bezeichnet einen Supershift nach Zugabe eines STAT3-spezifischen Antikörper und $\alpha S1$ einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper. (B) STAT1-WT und STAT1-E421K exprimierende U3R-Zellen wurden, wie in (A) beschrieben, für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin inkubiert. Die DNA-Bindeaktivität der STAT1-Varianten wurde in Gesamtzellextrakten nach Equilibrierung mit [32 P]-markierter M67-DNA und gelelektrophoretischer Auftrennung festgestellt. Der dimere STAT1-DNA-Komplex ist durch den Pfeil gekennzeichnet, der Stern markiert eine unspezifische Bindung.

Um die kooperative DNA-Bindung zu untersuchen, wurden ebenfalls EMSA-Analysen durchgeführt. Die kooperative DNA-Bindung resultiert aus der Fähigkeit der Proteine, stabile Tetramere an Tandem-GAS-Stellen zu bilden. Wie in **Abb. 7** zu sehen, zeigte sich kein Unterschied in der kooperativen DNA-Bindung zwischen der Punktmutante STAT1-E411A-GFP und -WT-GFP. Beide Varianten binden als Dimere an eine der beiden GAS-Stellen, dies zeigte sich in einem schneller wandernden dimeren STAT1-DNA-Komplex. Beide bilden aber auch Tetramere an der doppelten GAS-Stelle, entsprechend dem langsamer wandernden tetrameren STAT1-DNA-Komplex. Nach Zugabe eines 750-fachen Überschusses an nicht-radioaktiv markierter M67-DNA blieben die Tetramerbanden aufgrund der kooperativen Stabilisierung der tetrameren STAT1-Komplexe bestehen. Die Dimer-Komplexe beider STAT1-Varianten wurden vollständig oder teilweise ersetzt, dies ist ein weiterer Hinweis auf eine kooperative DNA-Bindung. Deutlich zu sehen ist, dass die Dimerbande in den Extrakten der STAT1-E411A-exprimierenden Zellen trotz Konkurrenz bestehen blieb. Dies kann als weiterer Beweis für eine verstärkte DNA-Bindung gewertet werden.

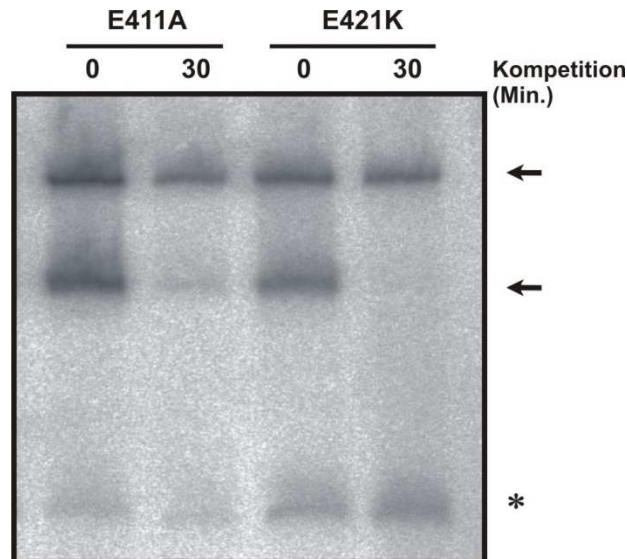


Abb. 7: Tetramerstabilisation der Mutanten STAT1-E411A-GFP und –E421K-GFP.

STAT1-E411A oder STAT1-E421K exprimierende U3R Zellen wurden 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert, anschließend Gesamtzellextrakte hergestellt und diese *in vitro* für 15 Min. mit [32 P]-markierter DNA-Sonde, bestehend aus einer zweifachen GAS-Stelle, inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden entweder unbehandelt gelassen oder für 30 Min. mit einem 750-fachen Überschuss einer unmarkierten M67-DNA inkubiert (Kompetition) und danach gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der obere Pfeil markiert den Komplex aus tetramerem STAT1 gebunden an DNA, der untere Pfeil dimere STAT1-DNA-Komplexe.

Durch die geschilderten EMSA-Experimente konnte zusammenfassend eine bessere DNA-Bindung der beiden Mutanten nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob diese einen Einfluss auf die Dephosphorylierung hat, wurden *In-vitro*-Dephosphorylierungsassays durchgeführt. Dafür wurden die Gesamtzellextrakte vor der Behandlung mit T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP) für 30 Min. bei 37°C mit DNase I inkubiert. Um einen eventuellen Einfluss der DNA-Bindung sichtbar zu machen, wurden die gleichen Extrakte in einem Vergleichsexperiment ohne DNase-I-Behandlung verwendet. Dafür wurden U3R-Zellen mit den jeweiligen pSTAT1-GFP-Derivaten transfiziert, für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Extrakte wurden dann vor der 30-minütigen TC-PTP-Behandlung bei 30°C mit DNase I inkubiert oder aber unbehandelt gelassen. Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot-Analyse. In **Abb. 8** ist die Dephosphorylierungskinetik der beiden Punktmutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Man kann deutlich erkennen, dass es zwischen den mit DNase I behandelten Zellextrakten und den nicht vorinkubierten Extrakten keinen Unterschied in der Dephosphorylierungskinetik gab. Beide Mutanten zeigten keine Dephosphorylierung nach 30-minütiger TC-PTP-Inkubation, für STAT1-WT dagegen wurde schon nach 15 Min. eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungslevels beobachtet.

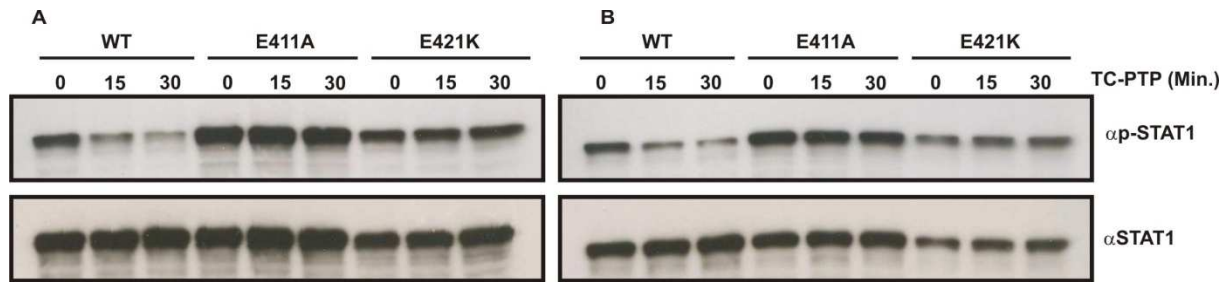


Abb. 8: STAT1-E411A-GFP und STAT1-E421K-GFP zeigen im Gegensatz zu STAT1-WT-GFP nach DNase-I-Behandlung *in vitro* keine Abnahme des Phosphorylierungslevels.

(A) GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A- und -E421K wurden durch vorherige 45-minütige IFN γ -Stimulation der sie exprimierenden U3R-Zellen Tyrosin-phosphoryliert. Daraus hergestellte Gesamtzellextrakte wurden für die angegebenen Zeiten mit TC-PTP bei 30°C inkubiert und anschließend in Western-Blot-Analysen untersucht. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper, im unteren Feld ist dieselbe Blot-Membran nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt. (B) Gesamtzellextrakte von GFP-markierten STAT1-WT, -E411A und -E421K exprimierenden und mit IFN γ (5 ng/mL, 45 Min.) prästimulierten U3R-Zellen wurden für 30 Min. bei 37°C mit DNase I inkubiert und danach für die angegebenen Zeiten mit TC-PTP bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden die Extrakte in Western-Blot-Analysen untersucht. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper, im unteren Feld ist dieselbe Blot-Membran nach stringenter Abwaschen der Antikörper und Reinkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

In einem weiteren Versuch wurde der Dephosphorylierungsassay mit cytosolischen Extrakten durchgeführt. In diesen Extrakten ist kein DNA-gebundenes STAT1 enthalten, welches das Ergebnis beeinflussen könnte. Dazu wurden cytosolische Extrakte der GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A und -E421K aus U3R-Zellen isoliert und für 0-30 Min. bei 30°C mit TC-PTP inkubiert. Wie in **Abb. 9** zu sehen, zeigten die beiden STAT1-Mutanten im Vergleich mit STAT1-WT-GFP eine deutlich verminderte Dephosphorylierungskinetik.

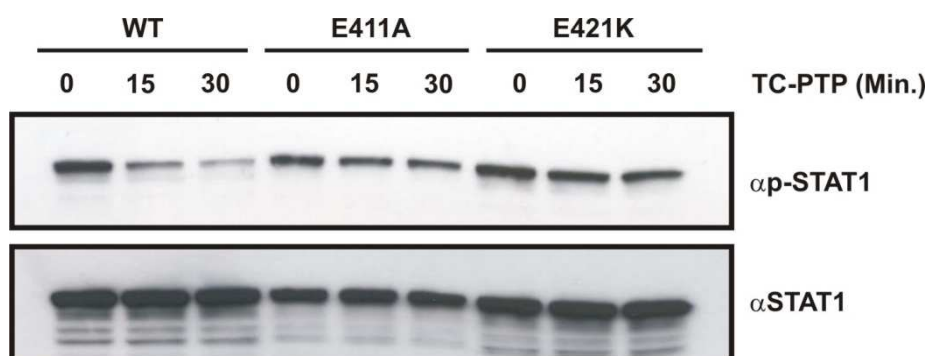


Abb. 9: Cytosolische Extrakte von STAT1-E411A-GFP und STAT1-E421K-GFP zeigen im Vergleich zu STAT1-WT-GFP *in vitro* eine verminderte Dephosphorylierungskinetik.

U3R-Zellen, die GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A und -E421K exprimierten, wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Anschließend wurden cytosolische Extrakte isoliert und diese für die angegebenen Zeiten mit TC-PTP bei 30°C inkubiert und anschließend in Western-Blot-Analysen untersucht. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper, im unteren Feld ist dieselbe Blot-Membran nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Substitution von zwei Glutaminsäure-Resten in den Positionen 411 und 421 des STAT1-Proteins den kontinuierlichen Dephosphorylierungs-/Rephosphorylierungs-Zyklus in IFN γ -stimulierten Zellen kritisch beeinflusste. Dies resultierte in erhöhten Phosphorylierungsspiegeln und verlängerten Phosphorylierungszeiten. Die Bindung an optimale GAS-Stellen sowie die kooperative DNA-Bindung waren jedoch nicht kompromittiert.

5.3 Tyrosin-phosphoryliertes STAT1-E411A schützt koexprimiertes endogenes STAT1 vor Inaktivierung

Die in U3R-Zellen beobachtete Insensitivität gegenüber Staurosporin bei beiden Punktmutanten E411A und E421K wurde auch in HeLa-S3-Zellen beobachtet, der Effekt ist demnach nicht vom Zelltyp abhängig. **Abb. 10A** zeigt die Dephosphorylierungskinetik nach Staurosporin-Gabe in HeLa-S3-Zellen. Auffällig ist, dass das koexprimierte endogene STAT1 der HeLa-S3-Zellen mutmaßlich durch Heterodimerisierung mit dem STAT1-E411A-GFP vor Dephosphorylierung geschützt wird. Der Effekt, den die Heterodimerisierung von STAT1-WT-GFP bzw. STAT1-E411A-GFP mit nativem STAT1 auf die Rate der Dephosphorylierung ausübt, zeigte sich in gleicher Weise auch in EMSA-Experimenten (**Abb. 10B**). Dazu wurden STAT1-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und, wie angegeben, anschließend mit Staurosporin inkubiert. Die Punktmutante STAT1-E411A-GFP bildete auch in dem Gelretardationsversuch Heterodimere mit endogenem STAT1. Auch nach 60-minütiger Staurosporin-Behandlung fand sich noch eine starke Bindung von STAT1-E411A-GFP an die radioaktiv-markierte M67-Sonde, die im Falle des Wildtyp-Moleküls deutlich schwächer ausfiel. Die Anwesenheit von STAT1-E411A-GFP schützt somit koexprimiertes natives Protein vor seiner schnellen Inaktivierung. STAT1-E421K-GFP zeigte im gleichen Versuchsaufbau das identische Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

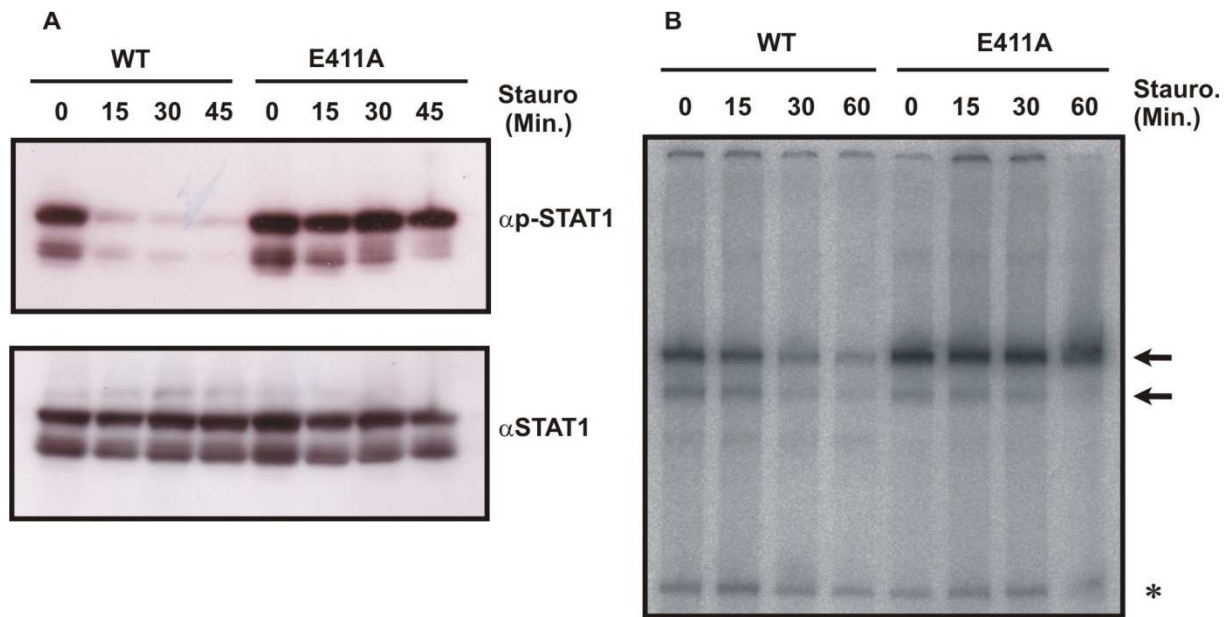


Abb. 10: Koexprimiertes endogenes STAT1 ist durch Heterodimerisierung mit STAT1-E411A-GFP vor seiner Inaktivierung geschützt.

(A) STAT1-WT-GFP bzw. STAT1-E411A-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin behandelt. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und diese anschließend in Western-Blot-Analysen untersucht. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist dieselbe Blot-Membran nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt. Die jeweils oberen Banden zeigen die STAT1-GFP-Fusionsproteine, die unteren Banden markieren endogenes STAT1. (B) STAT1-WT-GFP oder STAT1-E411A-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend wie in (A) mit Staurosporin behandelt. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und mit [32 P]-markierter M67-DNA für 15 Min. inkubiert. Die resultierenden STAT1-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der obere Pfeil zeigt STAT1-GFP Homodimere, der untere Pfeil Heterodimere von STAT1-GFP und nativem STAT1 an. Der Stern markiert eine unspezifische Bindung.

Die Dephosphorylierungskinetik mit Staurosporin wurde auch für die STAT1-E421K-Punktmutante in HeLa-S3-Zellen durchgeführt. In **Abb. 11** zeigt sich dabei ebenfalls eine Hyperphosphorylierung, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei STAT1-E411A. Hinzu kommt, dass das Verhältnis von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 zur gesamten STAT1-Menge bestehend aus phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem STAT1 im Falle der Mutante höher ist als beim unmutierten Molekül. In diesem Experiment konnte ebenfalls eine verzögerte Dephosphorylierung von endogenem STAT1 durch koexprimiertes STAT1-E421K-GFP gefunden werden.

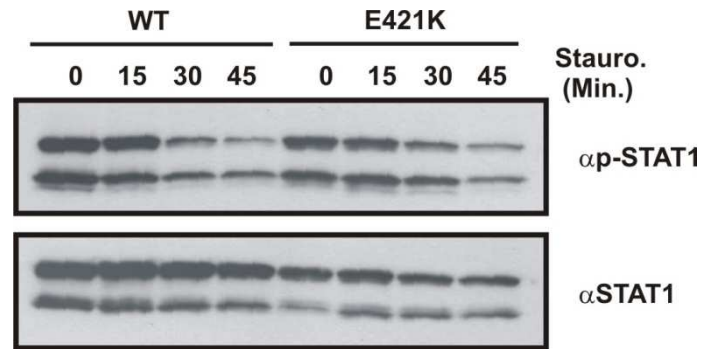


Abb. 11: Hyperphosphorylierung von STAT1-E421K-GFP.

STAT1-WT-GFP und STAT1-E421K-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ für unterschiedliche Zeiten mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. In Gesamtzellextrakten wurden das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung (oben) und die STAT1-Expression (unten) mit entsprechenden Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Die jeweils oberen Banden zeigen die STAT1-GFP-Fusionsproteine, die unteren Banden markieren endogenes STAT1.

Um zu untersuchen, ob die nukleäre und cytoplasmatische Verteilung von STAT1-E411A sich von STAT1-WT unterscheidet, wurden cytosolische und nukleäre Zellextrakte hergestellt. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit den Expressionsplasmiden pSTAT1-E411A bzw. pSTAT1-WT transfiziert, diese einen Tag später mit IFN γ stimuliert und anschließend im Western-Blot-Verfahren analysiert. Wie in **Abb. 12** gezeigt, war der Anteil an nukleärem phosphoryliertem STAT1-E411A-GFP signifikant höher als der von STAT1-WT-GFP. Dagegen war in den cytosolischen Extrakten im Vergleich mehr phosphoryliertes STAT1-WT-GFP Protein vorhanden. Auch die zweite Mutante, STAT1-E421K-GFP, zeigte nach IFN γ -Stimulation ebenfalls deutlich mehr Präsenz im Zellkern als im Cytoplasma.

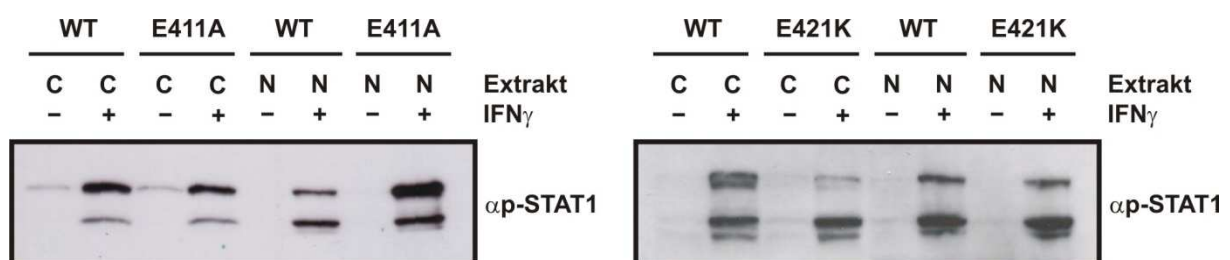


Abb. 12: Veränderte nukleäre und cytoplasmatische Verteilung von STAT1-E411A-GFP und STAT1-E421K-GFP.

HeLa-S3-Zellen, die GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A und -E421K exprimierten, wurden unstimuliert belassen oder für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Nukleäre (N) und cytosolische Extrakte (C) wurden isoliert und diese in Western-Blot-Analysen mit Phospho-STAT1 spezifischem Antikörper untersucht. Es wurden jeweils vergleichbare Mengen an endogenem STAT1 aufgetragen (untere Banden). Das Gleichgewicht der Phospho-STAT1-Verteilung ist bei beiden Mutanten in Richtung Zellkern verschoben, bei STAT1-WT dagegen zum Cytoplasma hin.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Konzentration von Tyrosinphosphoryliertem STAT1 nach Mutation des kritischen Glutaminsäure-Restes

411 deutlich erhöht war, was in einer ausgeprägten nukleären Akkumulation resultierte.

5.4 Die Punktmutanten STAT1-E411A und STAT1-E421K haben eine hohe Affinität zu GAS-Stellen

Um den molekularen Mechanismus des veränderten Aktivierungs-/Inaktivierungs-Zyklus bei beiden Mutanten zu verstehen, wurde deren DNA-Bindeverhalten näher untersucht. Die veränderte DNA-Bindung der beiden Glutaminsäure-Mutanten zeigte sich deutlich in **Abb. 13**. Dazu wurden Kompetitions-Gelshifts in Gegenwart von nicht-radioaktiver M67-DNA für unterschiedliche Inkubationszeiten nach 15-minütiger Vorinkubation mit [32 P]-markierter M67-DNA durchgeführt.

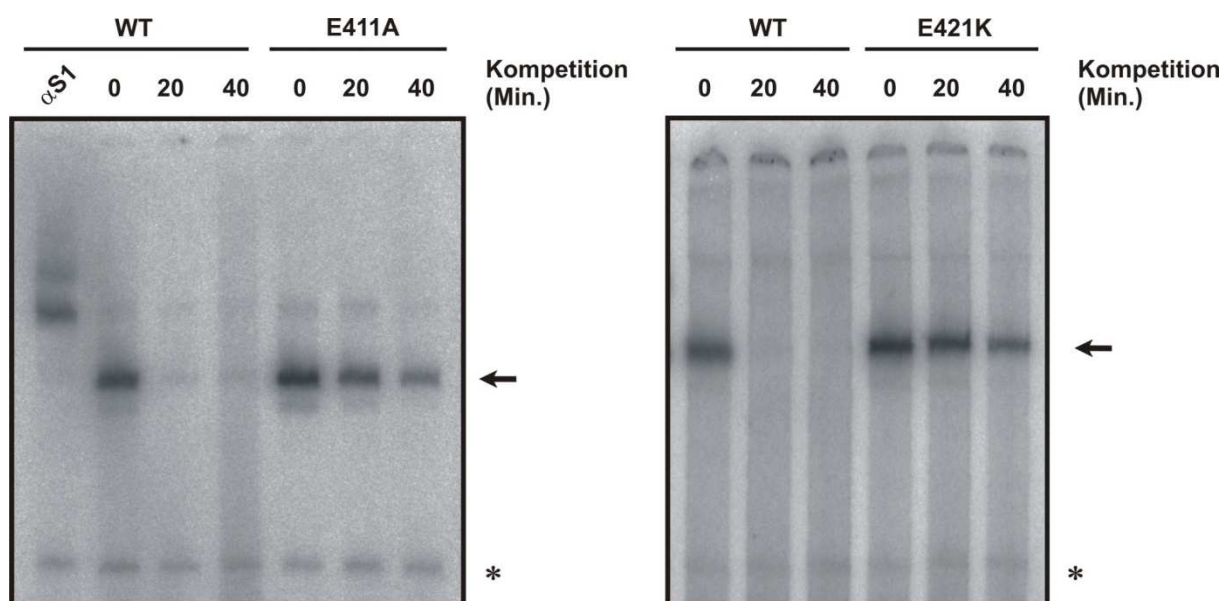


Abb. 13: STAT1-E411A-GFP und STAT1-E421K-GFP zeigen eine verminderte Dissoziationsrate von DNA.

STAT1-WT-GFP und -E411A-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen sowie STAT1-E421K exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und danach Gesamtzellextrakte hergestellt. Nach einer Inkubation der Extrakte mit [32 P]-markierter M67-DNA wurde ein 750-facher Überschuss von nicht-radioaktiv markierter M67-DNA für die angegebenen Zeiten zugegeben. Danach folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. Der Pfeil zeigt den dimeren STAT1-DNA-Komplex an, der Stern markiert eine unspezifische Bindung. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper, dieser bestätigt die Identität der Bande.

Die Versuche lassen erkennen, dass beide Mutanten eine extrem verminderte Dissoziationsrate von DNA aufwiesen. Die Ablösung von einer radioaktiv-markierten optimalen GAS-Stelle war deutlich beeinträchtigt und resultierte in einer deutlich längeren Halbwertszeit von GAS-gebundenen Dimeren im Vergleich zu STAT1-WT. Die

Stabilität der durch Vorinkubation entstandenen Protein-DNA-Komplexe der beiden Mutanten unterscheidet sich signifikant von der weitaus geringeren Stabilität des STAT1-DNA-Komplexes bei dem Wildtyp-Protein.

Als einen weiteren Beweis der veränderten DNA-Bindungseigenschaften der beiden Mutanten wurde ein Transportassay in permeabilisierten Zellen durchgeführt. STAT1-WT-GFP, -E411A-GFP bzw. -E421K-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden jeweils für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert, um eine Kernakkumulation zu induzieren. Danach wurden die Zellen entweder sofort fixiert oder für 6 Min mit 50 μ g/mL Digitonin in Transportpuffer auf Eis behandelt und dann fixiert. Digitonin permeabilisiert in dieser Konzentration selektiv die Plasmamembran, unter Erhalt der strukturellen Integrität der Kernmembran. Dabei werden die cytoplasmatischen Proteine freigesetzt, doch die Kernmembran bleibt in ihrer strukturellen Integrität unversehrt. Wie erwartet, resultierte eine IFN γ -Stimulation in einer Kernakkumulation von STAT1-GFP bei den drei Varianten, gezeigt in **Abb. 14**. Nach Permeabilisierung mit Digitonin wurde die nukleäre Präsenz von STAT1-WT-GFP vollständig aufgehoben, die beiden STAT1-GFP-Mutanten blieben aber trotz Digitonin-Einwirkung im Zellkern akkumuliert.

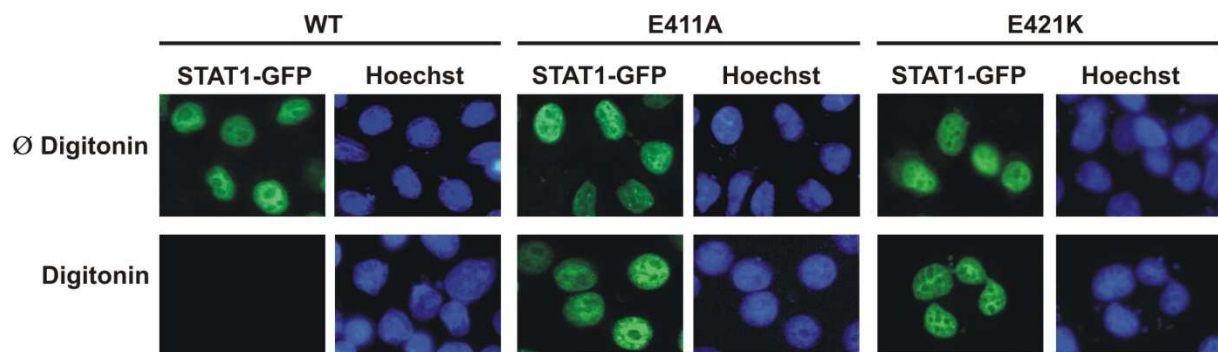


Abb. 14: Substitution zweier Aminosäurereste in der DNA-Bindedomäne von STAT1 resultiert in einem verminderten nukleären Export.

GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A und -E421K exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Danach wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (obere Reihe) oder für 6 Min. mit 50 μ g/mL Digitonin auf Eis inkubiert (untere Reihe). Nach Fixierung mit 4% Formalin wurden die Zellkerne mit Hoechst gefärbt und die Präparate fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt sind die GFP-Fluoreszenzen mit den dazugehörigen Hoechst-Färbungen der Zellkerne.

Diese Experimente zeigen, dass die nukleäre Exportrate der beiden DNA-Bindemutanten im Vergleich zu STAT1-WT deutlich vermindert ist.

Im nächsten Versuch sollten die Sequenz-Anforderungen für die DNA-Bindung von STAT1-WT mit denen von STAT1-E411A und -E421K verglichen werden. Dazu wurden in EMSA-Experimenten nicht-optimale GAS-Stellen als Sonden eingesetzt. Wie in **Abb. 15** zu sehen, fand in Gesamtzellextrakten nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation der transfizierten Zellen eine Bindung der drei STAT1-Varianten an die 2xGAS bzw. die M67-DNA sowie an die GAS-nonGAS-Sonde, welche eine GAS-Bindestelle aufweist, statt. Bei STAT1-E411A-GFP zeigte sich zusätzlich eine deutliche Bindung an die 2xnonGAS-Bindestelle. Diese enthält nach Austausch von zwei Nukleotiden keine intakte GAS-Stelle mehr. STAT1-E421K-GFP zeigte ebenfalls ein schwaches Bindesignal an diese Sonde. Auch wenn die Signale von DNA-gebundenem STAT1-E411A-GFP und STAT1-E421K-GFP an der 2xnonGAS-Sonde im Vergleich zu einer Konsensus-GAS-Stelle schwach sind, wird deutlich, dass für eine Bindung dieser STAT1-Dimere an DNA keine intakte GAS-Stelle notwendig ist.

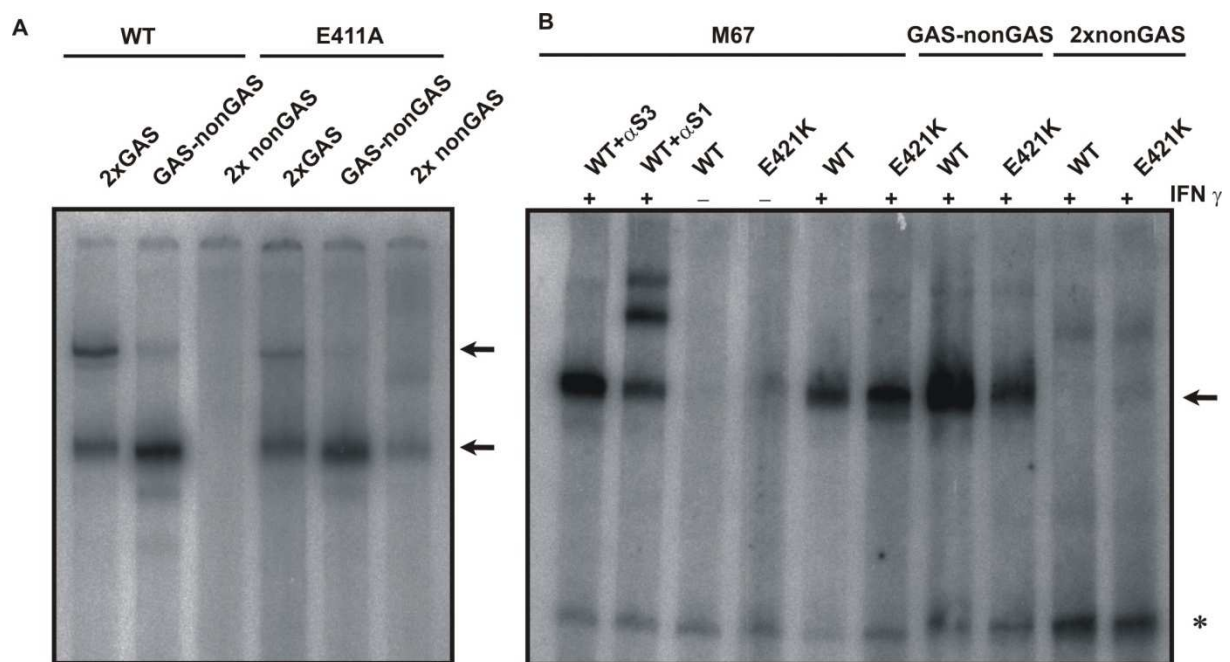


Abb. 15: Bindung an unspezifischen DNA-Bindestellen von STAT1-E411A und STAT1-E421K.

(A) Nach 45 Min. Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP und STAT1-E411A-GFP exprimierenden U3R-Zellen hergestellt und wie angegeben für 15 Min. mit den jeweiligen [32 P]-markierten Sonden inkubiert. Verwendet wurden eine zweifache GAS-Stelle (2xGAS), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle im Tandem (GAS-nonGAS) und eine zweifache Nicht-GAS-Stelle (2xnonGAS). Danach erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung im nicht-denaturierenden SDS-Gel. Der untere Pfeil verweist auf dimere STAT1-DNA-Komplexe und der obere Pfeil auf die Tetramerbande. (B) Wie angezeigt, wurden STAT1-WT-GFP und STAT1-E421K-GFP exprimierende U3R-Zellen unstimuliert belassen oder für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt und wie angegeben für 15 Min. mit den jeweiligen [32 P]-markierten Sonden inkubiert. Verwendet wurden eine GAS-Stelle (M67), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle im Tandem (GAS-nonGAS) und eine zweifache nicht-GAS-Stelle (2xnonGAS). Nach der Inkubation erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper. Der Pfeil verweist auf die dimeren STAT1-DNA-Komplexe und der Stern markiert eine unspezifische Bindung.

Die beiden Mutanten widerstanden der Competition mit nicht-radioaktiv markierter, hoch-affiner DNA im Überschuss nicht nur weitaus besser, sondern sie zeigten zusätzlich eine deutlich höhere Affinität zu DNA als STAT1-WT (**Abb. 15**). Des Weiteren wurde in diesem Experiment deutlich, dass die Fähigkeit an DNA zu binden nicht auf GAS-Stellen begrenzt ist, die Mutanten also ein breiteres Repertoire an Bindestellen besitzen.

5.5 Eine geringe Dissoziationsrate von DNA resultiert in verlängerter Zytokin-induzierter Kernakkumulation

Die subzelluläre Verteilung von STAT1 wird über mehrere Mechanismen und Signale reguliert. Um den Einfluss der DNA-Bindung auf die Dauer der Kernakkumulation von STAT1 zu erforschen, wurde die Lokalisation der GFP-markierten STAT1-Derivate in HeLa-S3-Zellen untersucht. Das Verhalten von endogenem STAT1 ist dem von C-terminalen STAT1-Fusionsproteinen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* vergleichbar, doch haben die GFP-Addukte eine verringerte Exportrate (Köster und Hauser, 1999; Begitt et al., 2000; Marg et al., 2008). Eine Stimulation mit IFN γ führt somit zu einer Aktivierung und Kernakkumulation von GFP-markiertem STAT1-WT.

Abb. 16 zeigt die subzelluläre Verteilung von STAT1-WT-GFP und den zwei STAT1-Mutanten E411K-GFP und E421K-GFP. In unstimulierten Zellen wiesen alle STAT1-Derivate eine annähernd panzelluläre Verteilung auf, dies belegt die Fähigkeit zur Passage der Kernmembran. Eine Stimulation mit IFN γ führte bei allen STAT1-Derivaten zu einer Kernakkumulation des Proteins. Nach Stimulation mit IFN γ und einer darauf folgenden 60-minütigen Behandlung mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin zeigte sich ein beachtlicher Unterschied in der zellulären Verteilung zwischen STAT1-WT und den beiden Punktmutanten. Beide Mutanten waren weiterhin im Kern akkumuliert, während STAT1-WT-GFP wieder seine panzelluläre Ruheverteilung eingenommen hatte und nicht mehr in einem kernakkumulierten Zustand vorlag.

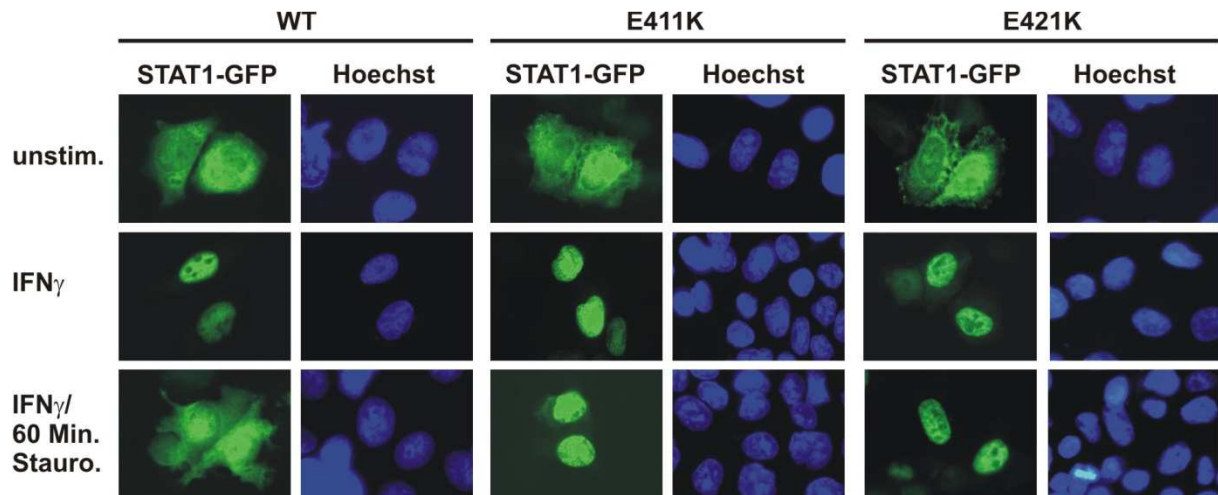


Abb. 16: Nach IFN γ -Stimulation mit anschließender Staurosporin-Behandlung zeigen STAT1-E411K-GFP und STAT1-E421K-GFP im Vergleich mit STAT1-WT-GFP eine verlängerte nukleäre Akkumulationsphase.

STAT1-WT-GFP, -E411K-GFP bzw. -E421K-GFP exprimierende HeLa-S3 -Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert, mit und ohne anschließender Staurosporin-Behandlung (1 h, 1 μ M). Danach wurden die Zellen mit 4% Formalin fixiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt. Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisation der entsprechenden STAT1-GFP-Proteine im Fluoreszenzmikroskop mit der zugehörigen Hoechst-Färbung.

Um Artefakte, welche durch den GFP-Anteil des Fusionsproteins hervorgerufen sein könnten, auszuschließen, wurde der vorherige Versuch mit pcDNA3.1-STAT1-Derivaten wiederholt. Aus der Literatur ist bekannt, dass GFP-Fusionsproteine von STAT1 eine gegenüber dem nativen Protein verzögerte nukleäre Exportrate aufweisen (Marg et al., 2008). Die Detektion der exprimierten, nicht-GFP-markierten STAT1-Proteine in U3R-Zellen erfolgte immuncytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper. In **Abb. 17** zeigt sich die bereits für die GFP-Addukte dokumentierte, deutlich verlängerte Kernakkumulationsdauer der beiden unkonjugierten STAT1-Punktmutanten. Der GFP-Anteil ist daher nicht für den Phänotyp der mutierten Fusionsproteine verantwortlich, sondern hierbei handelt es sich um eine inhärente Eigenschaft der Mutanten als Folge des Aminosäureaustausches in der DNA-Bindedomäne.

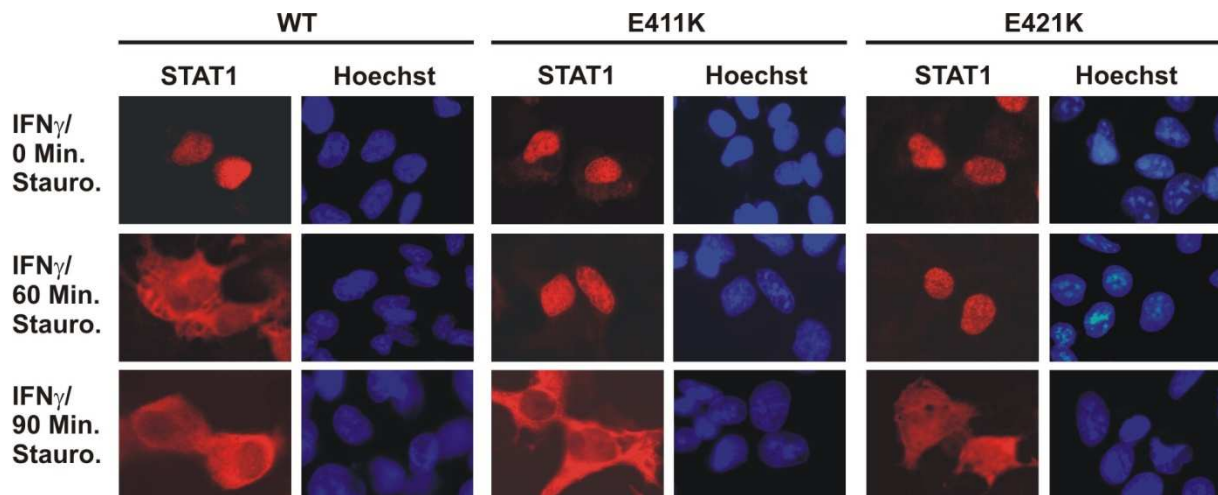


Abb. 17: Die verlängerte nukleäre Akkumulationsphase von STAT1-E411K und STAT1-E421K ist unabhängig vom GFP-Anteil.

STAT1-WT, -E411K oder -E421K exprimierende U3R-Zellen wurden 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Die STAT1-Lokalisation wurde immunocytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper und Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege detektiert, die Zellkerne anschließend mit Hoechst-Farbstoff gegengefärbt.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die verminderte Dephosphorylierungsrate und die verlängerte Kernakkumulation inhärente Eigenschaften der beiden Glutaminsäure-Mutanten sind, die direkt aus der geringen Dissoziationsrate von DNA resultieren.

5.6 Hohe Bindungs-Affinität zu DNA supprimiert die transkriptionelle Aktivität von STAT1

Als nächstes wurde untersucht, welche weiteren Auswirkungen die erhöhte DNA-Affinität hinsichtlich transkriptioneller Aktivierung von STAT1-Zielgenen hat. Es wurden Reporterassays durchgeführt, um den Einfluss der verminderten Dissoziation von DNA auf die Aktivierung der Genexpression zu ermitteln. Dazu wurde ein Luciferase-Reporter, reguliert durch einen synthetischen Promotor mit dreifacher GAS-Stelle im Abstand von 10 bp, eingesetzt. Wie in **Abb. 18** ersichtlich, zeigten die in U3R-Zellen exprimierten GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E411A, -E411K und -E421K eine transkriptionelle Antwort nach 6-stündiger IFN γ -Stimulation. In den Zellen, die mutiertes STAT1 exprimierten, war die Geninduktion signifikant supprimiert, STAT1-E411K zeigte dabei die geringste Reporter-Gen-Aktivierung der getesteten Mutanten. Das Ausmaß der transkriptionellen Aktivität lässt sich wie folgt ordnen: STAT1-WT > STAT1-E411A > STAT1-E421K > STAT1-E411K. Folglich wird durch den Austausch des negativen Glutaminsäure-Rests gegen einen neutralen oder posi-

tiv geladenen Rest die transkriptionelle Aktivität des Proteins an einem starken, Zytokin-induzierbaren Promotor schrittweise vermindert.

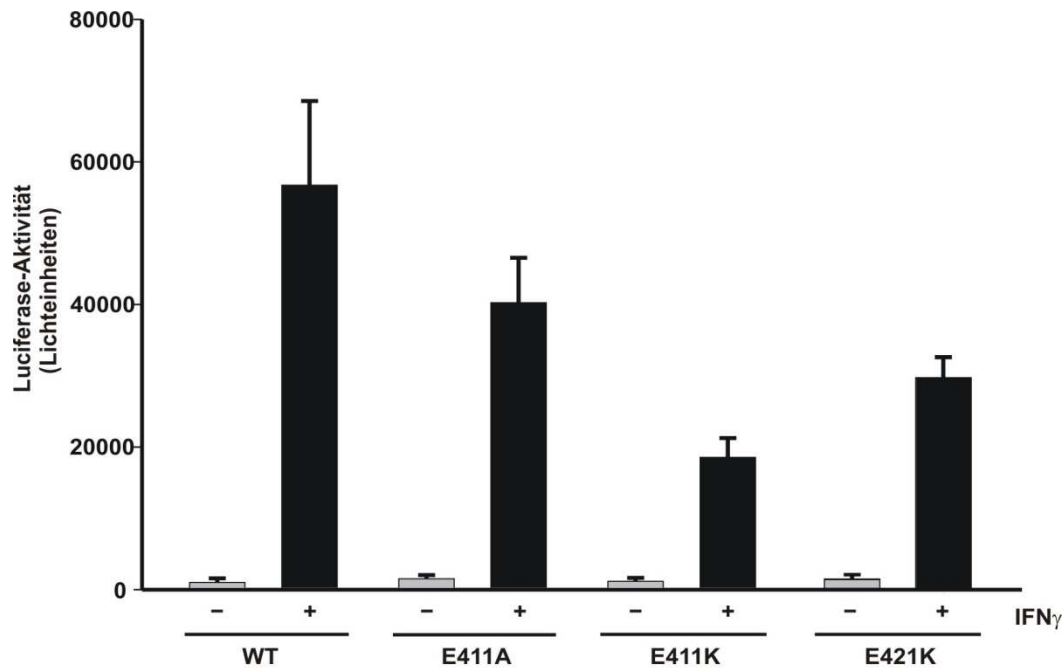


Abb. 18: Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-Mutanten mit hoher Affinität zu GAS-Stellen ist im Reporterassay mit einem IFN γ -responsiven Luciferasereporter vermindert.

U3R-Zellen wurden mit den pSTAT1-GFP-Plasmiden für WT oder den Mutanten E411A, E411K und E421K sowie p β Gal und pGAS3xLy6E transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt, daraus die Luciferase-Aktivität gemessen und auf die β -Galactosidase-Aktivität normiert.

Reporterassays mit zwei nativen Promotoren führten zu dem gleichen Ergebnis wie die Versuche mit dem 3xLy6E-Promotor, die STAT1-Punktmutanten waren transkriptionell schlechter als das Wildtyp-Protein (**Abb. 19**). Transient transfizierte U3R-Zellen mit den pSTAT1-Plasmiden für WT, E411A und E421K sowie den Plasmiden p β Gal und pIC-339 bzw. pIC-1352 wurden entweder nicht oder für 6 h mit IFN γ stimuliert. Danach erfolgte eine Analyse mittels Luciferase-Assay und eine Normierung auf die β -Galactosidase-Aktivität. pIC-339 ist ein Luciferase-Reporter, welcher eine trunkierte Form des Promotors für das humane Intrazelluläre-Adhäsions-Molekül-1- (ICAM-1)-Gens enthält, pIC-1352 enthält den Volle-Länge-Promotor (Hou et al., 1994; Van de Stolpe et al., 1994). Diese Promotoren beinhalten eine singuläre, kanonische GAS-Stelle.

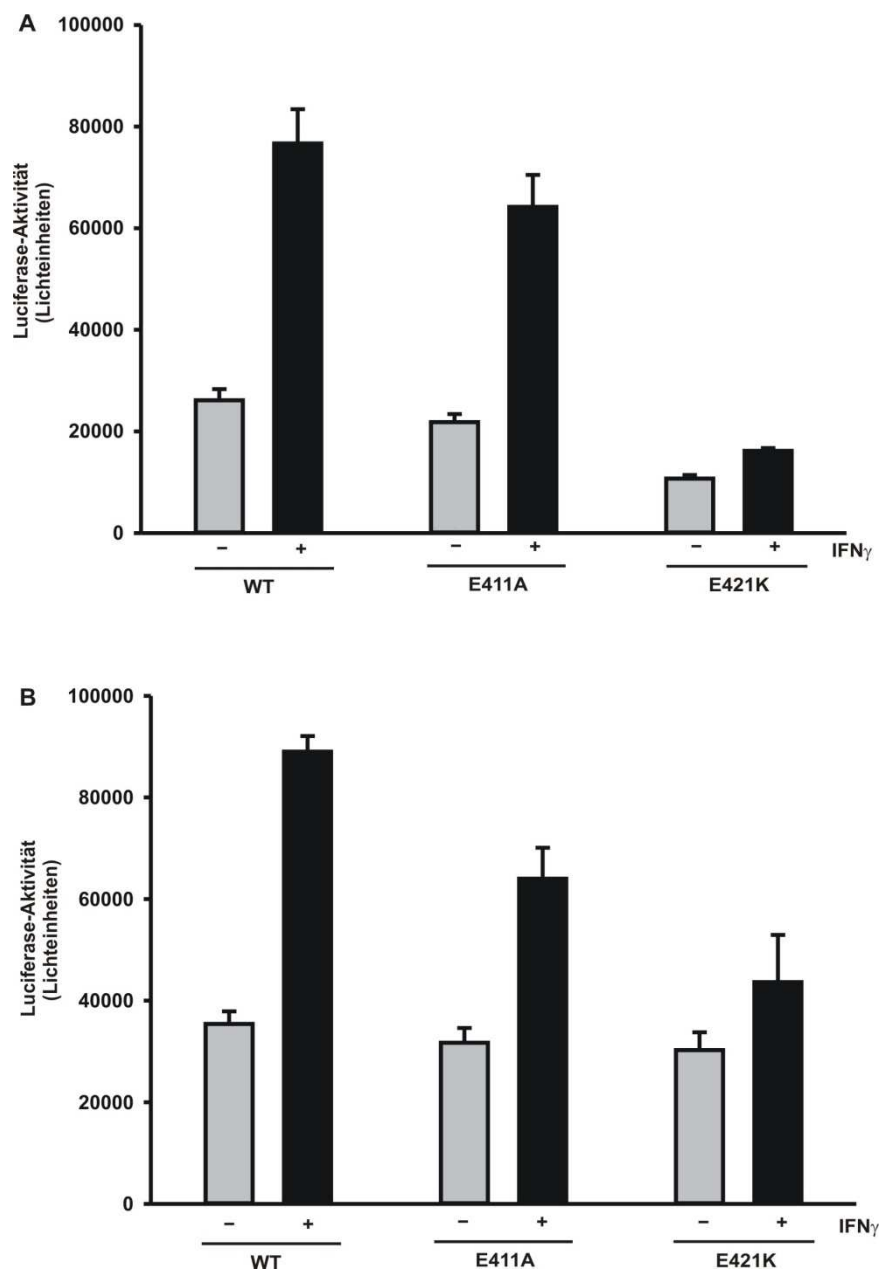


Abb. 19: Verminderte Genaktivierung von STAT1-E411A und -E421K an zwei nativen Promotoren im Luciferase-Assay.

(A) U3R-Zellen wurden mit den Plasmiden pSTAT1-WT, -E411A und -E421K sowie mit pIC-339 und p β Gal transfiziert. 16 h danach erfolgte eine Stimulation für 6 h mit IFN γ (5 ng/mL) oder keine Stimulation; nach Herstellung der Zellextrakte wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Die Normierung wurde auf die β -Galactosidase-Aktivität der jeweiligen Proben vorgenommen. (B) Transient transfizierte U3R-Zellen mit den Plasmiden für STAT1-WT-GFP, -E411A-GFP, -E421K-GFP, β Gal sowie dem Plasmid pIC-1352 wurden zur Hälfte am nächsten Tag mit 5 ng/mL IFN γ für 6 h stimuliert. An isolierten Zellextrakten wurden die Luciferase- sowie die β -Galactosidase-Aktivitäten gemessen, auf letztere erfolgte die Normierung der Proben.

Zur *In-vivo*-Untersuchung dreier endogener, IFN γ -induzierbarer Gene wurden Real-Time-RT-PCR-Analysen mit pcDNA3.1-STAT1 transfizierten U3R-Zellen durchgeführt. 16-24 h nach der Transfektion wurde das Vollmedium der U3R-Zellen gegen ein Medium mit 1% FBS ausgetauscht und nach weiteren 15 h erfolgte die Behandlung durch Zugabe von IFN γ . Dazu wurden die transfizierten Zellen entweder unstimuliert belassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Auch hier zeigte sich, dass die Mutanten STAT1-E411A, STAT1-E411K und STAT1-E421K eine verminderte transkriptionelle Aktivität besaßen (**Abb. 20**). Die *stat1*-mRNA Expression wurde erwartungsgemäß in allen Proben detektiert. Die Zielgene *irf1* und *mig1* wurden in den U3R-Zellen, welche die STAT1-Mutanten exprimierten, nur vermindert aktiviert. Die *gbp1*-Expression war in den Zellen, die mutierte STAT1-Proteine exprimierten, entweder stark beeinträchtigt oder komplett verschwunden.

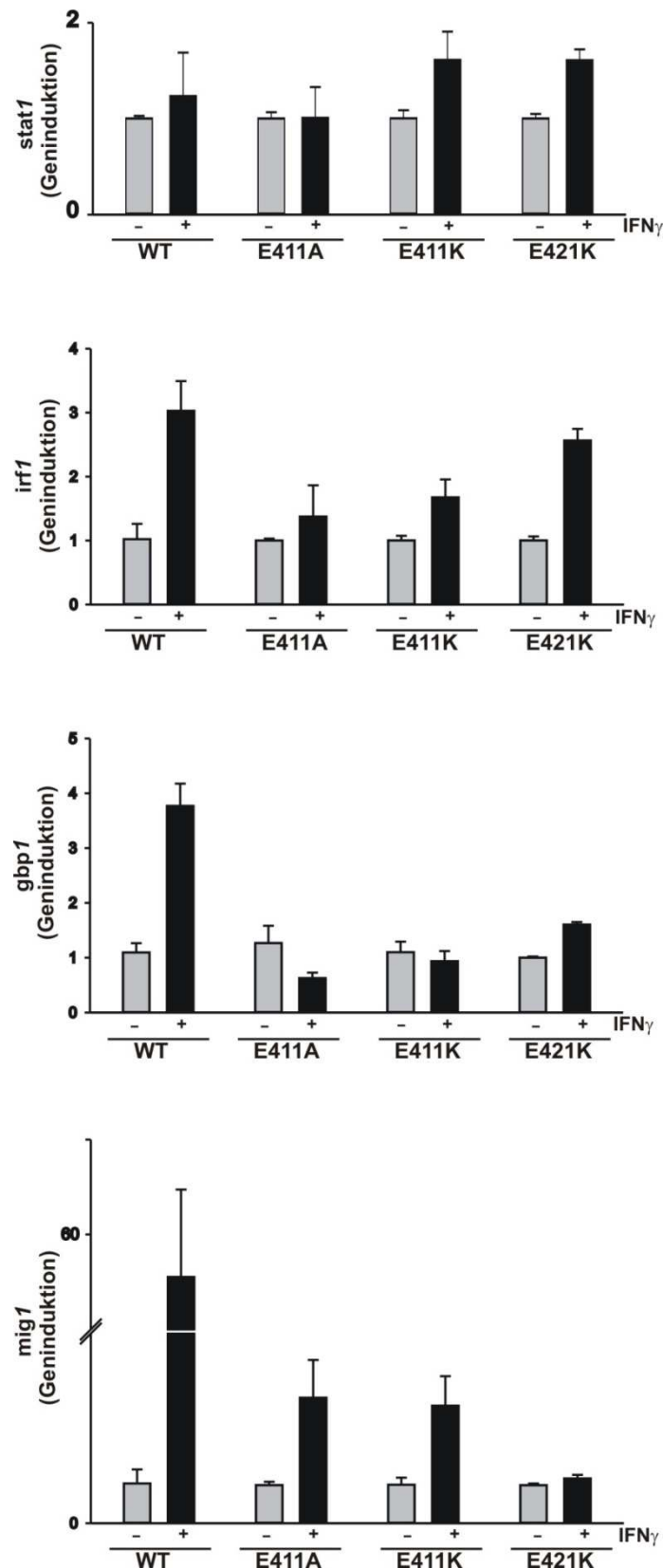


Abb. 20: Verminderte Zielgenaktivierung *in vivo* durch STAT1-E411A, -E411K und -E421K.

U3R-Zellen wurden mit den entsprechenden pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden transfiziert, 16-24 h nach Transfektion wurde das Vollmedium gegen Medium mit 1% FBS ausgetauscht und 15 h später wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder mit 5 ng/mL IFN γ für 6 h stimuliert. RNA wurde isoliert, daraus cDNA hergestellt und anschließend mittels Real-Time-PCR die Expression der Gene *stat1*, *irf1*, *mig1* und *gbp1* analysiert. Die Genaktivierung wurde auf die jeweiligen Werte der *gapdh*-Messung normalisiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine hohe DNA-Bindungsaffinität bei erhaltener GAS-Erkennung mit erniedrigter Zielgenaktivierung gekoppelt ist. Die supprimierte Genaktivierung könnte möglicherweise auf eine verminderte Bindung am Promotor des jeweiligen Zielgenes zurückzuführen sein. Deshalb wurde in Chromatin-Immunpräzipitationen untersucht, ob die STAT1-E411A-Mutante an Promotorbereichen von nativen, Zytokin-induzierbaren Genen mit niedrigerer Besetzungsrate bindet als das Wildtyp-Molekül. Dazu wurden STAT1-WT und STAT1-E411A exprimierende U3R-Zellen, die vorher für 15 h in 1% FBS-haltigem Medium kultiviert wurden, entweder unstimuliert belassen, für 30 Min. mit IFN γ stimuliert oder nach IFN γ -Stimulation für weitere 30 Min. mit Staurosporin behandelt. Wie in **Abb. 21** gezeigt, konnte nach Chromatin-Immunpräzipitation mittels PCR der Promotor für *irf1* nachgewiesen werden.

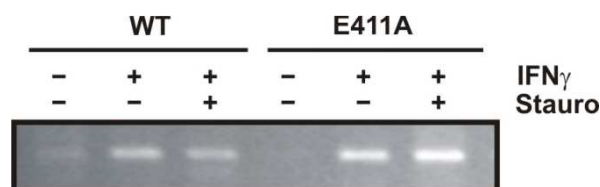


Abb. 21: Verlängerte Promotor-Bindung von STAT1-E411A am *irf1*-Promotor.

STAT1-WT und STAT1-E411A exprimierende U3R-Zellen wurden nach 15 h Inkubation in Medium mit 1% FBS für 30 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Zellen entweder sofort oder nach 30-minütiger Staurosporin-Inkubation durch Zugabe von Formalin in einer Endkonzentration von 1% fixiert. Eine Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender DNA-Fällung wurde durchgeführt und danach mittels PCR der *irf1*-Promotor nachgewiesen. Gezeigt ist ein Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Lichtbestrahlung.

In den Staurosporin-behandelten Zellen konnte damit Promotor-gebundenes STAT1-E411A nachgewiesen werden. Bei STAT1-WT konnte ebenfalls eine Bindung an den *irf1*-Promotor nachgewiesen werden, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass STAT1-E411A trotz Hemmung der Tyrosin-Kinase-Aktivität nicht deaktiviert wird und dass die Zielgenerkennung nicht beeinträchtigt ist.

5.7 Während der nukleären Akkumulation lagert sich STAT1-E411A an transkriptionell inaktive Bindestellen an

Um die physiologische Funktion der nukleären Akkumulation von STAT1 zu untersuchen, wurde eine hyperaktive nukleäre Exportmutante, STAT1-NES-GFP, bestehend aus einem transferierbaren STAT1-Fragment, der die Aminosäurereste von 367-427

enthält, eingesetzt. Das Exportsignal befindet sich zwischen dem Carboxyterminus von STAT1 und GFP. Die NES-Mutante zeigte aufgrund eines heterotopen, autologen nukleären Exportsignals (NES) eine vorwiegend cytoplasmatische Ruheverteilung. Diese unterschied sich deutlich von der panzellulären Verteilung des Wildtyp-Proteins, wie in **Abb. 22** gezeigt. Weder eine Stimulation mit IFN γ noch eine Behandlung mit dem Export-Inhibitor Leptomycin B (LMB) veränderte diese Verteilung.

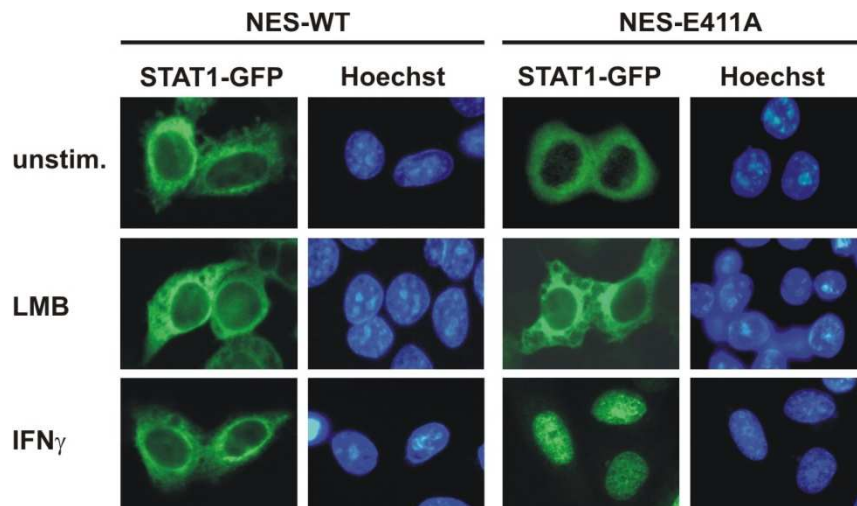


Abb. 22: Eine STAT1-Mutante mit erhöhtem nukleären Export bestätigt den DNA-Bindungs-Phänotyp von STAT1-E411A.

HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-NES-GFP, einem Expressionsplasmid, welches für STAT1-NES-GFP mit einem STAT1-spezifischen nukleären Exportsignal (NES) kodiert, bzw. einer Mutante dieses Konstrukts mit E411A, transfiziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag entweder unstimuliert belassen, für 45 Min. mit 10 ng/mL Leptomycin B oder für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt. Gezeigt sind die intrazelluläre Lokalisation der GFP-Addukte und die zugehörige Kernfärbung in den fixierten Zellen.

Eine Doppelmutante bestehend aus dem transferierbaren NES-Signal carboxyterminal von STAT1 und der E411A-Punktmutation wurde hergestellt. Diese Doppelmutante zeigte in der Ruheverteilung sowie nach LMB-Behandlung den gleichen Phänotyp wie STAT1-NES-GFP. Nach 45 Min. Stimulation mit IFN γ akkumulierte die Doppelmutante STAT1-NES-E411A-GFP, anders als das Fusionsprotein STAT1-NES-GFP, im Zellkern. Durch Einführung der Punktmutation E411A kommt es also zu einer Konkurrenz zwischen übermäßigem nukleären Export und der starken DNA-Bindung. Das Gleichgewicht verschiebt sich dabei zur verstärkten DNA-Bindung, dadurch zeigt sich eine deutliche Kernakkumulation der Doppelmutante. Dieses Ergebnis unterstreicht den Befund, dass die hohe DNA-Bindungsaffinität der Schlüssel zum Verständnis des Phänotyps der E411A-Punktmutante ist.

Als nächstes wurde das Kernakkumulations-Verhalten der beiden STAT1-NES-Varianten bei gleichzeitiger Behandlung mit IFN γ und LMB analysiert. Wie in **Abb. 23** zu sehen, zeigte sich nach Inhibierung des nukleären Exportsignals mit LMB und gleichzeitiger Stimulation mit IFN γ nach 45 Min. eine Kernakkumulation, unabhängig von der E411A-Mutation. Die Doppelmutante war schon nach 30-minütiger IFN γ -Behandlung im Zellkern retiniert, zu diesem Zeitpunkt befand sich STAT1-NES-GFP-Molekül noch hauptsächlich im Cytosol. Das Gleichgewicht verschiebt sich demnach schneller in Richtung Kernakkumulation als bei STAT1-NES-GFP.

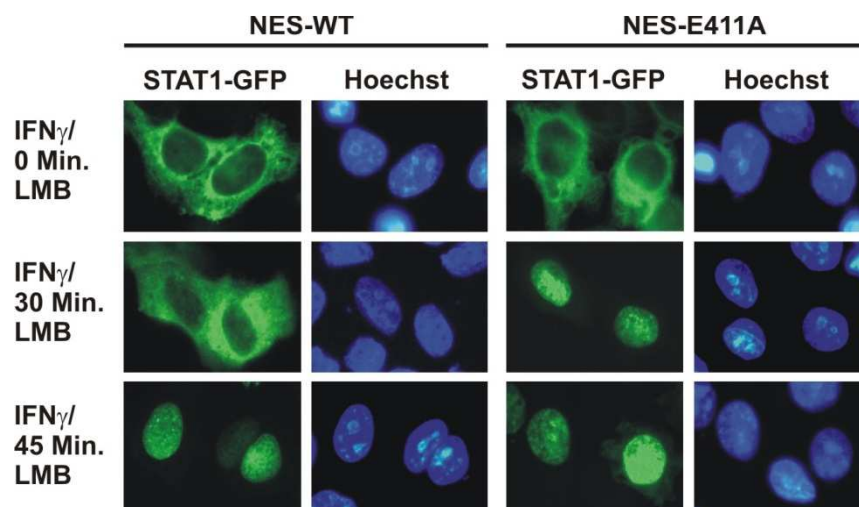


Abb. 23: Die Mutation E411A beschleunigt den Aufbau der nukleären Präsenz von STAT1-NES-GFP bei simultaner Behandlung mit LMB und IFN γ .

HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-NES-GFP oder dem Expressionsplasmid, welches für STAT1-NES-E411A-GFP kodiert, transfiziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit 10 ng/mL LMB und 5 ng/mL IFN γ für die angegebenen Zeiten kostimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt. Gezeigt sind die GFP-Fluoreszenzen und die dazugehörige Kernfärbung.

Durch die Anwesenheit eines hyper-physiologischen NES wurden zwei unterschiedliche Auswirkungen der E411A-Mutation deutlich. Zum Einen kam es zu einer Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation auch ohne den Einfluss von LMB. Zusätzlich beschleunigte die Mutation den Aufbau eines kernakkumulierten Zustands von STAT1-NES unter gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit IFN γ und LMB.

Bei der Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der beiden STAT1-NES-GFP Varianten zeigte sich unerwartet, dass eine nukleäre Akkumulation für die Genaktivierung entbehrlich ist. STAT1-NES-GFP wurde nach Stimulation mit IFN γ nicht in dem Zellkern retiniert (**Abb. 22**), trotzdem wurde in RT-PCR-Versuchen eine deutliche transkriptionelle Aktivität an zwei nativen Zielgenen beobachtet (**Abb. 24**).

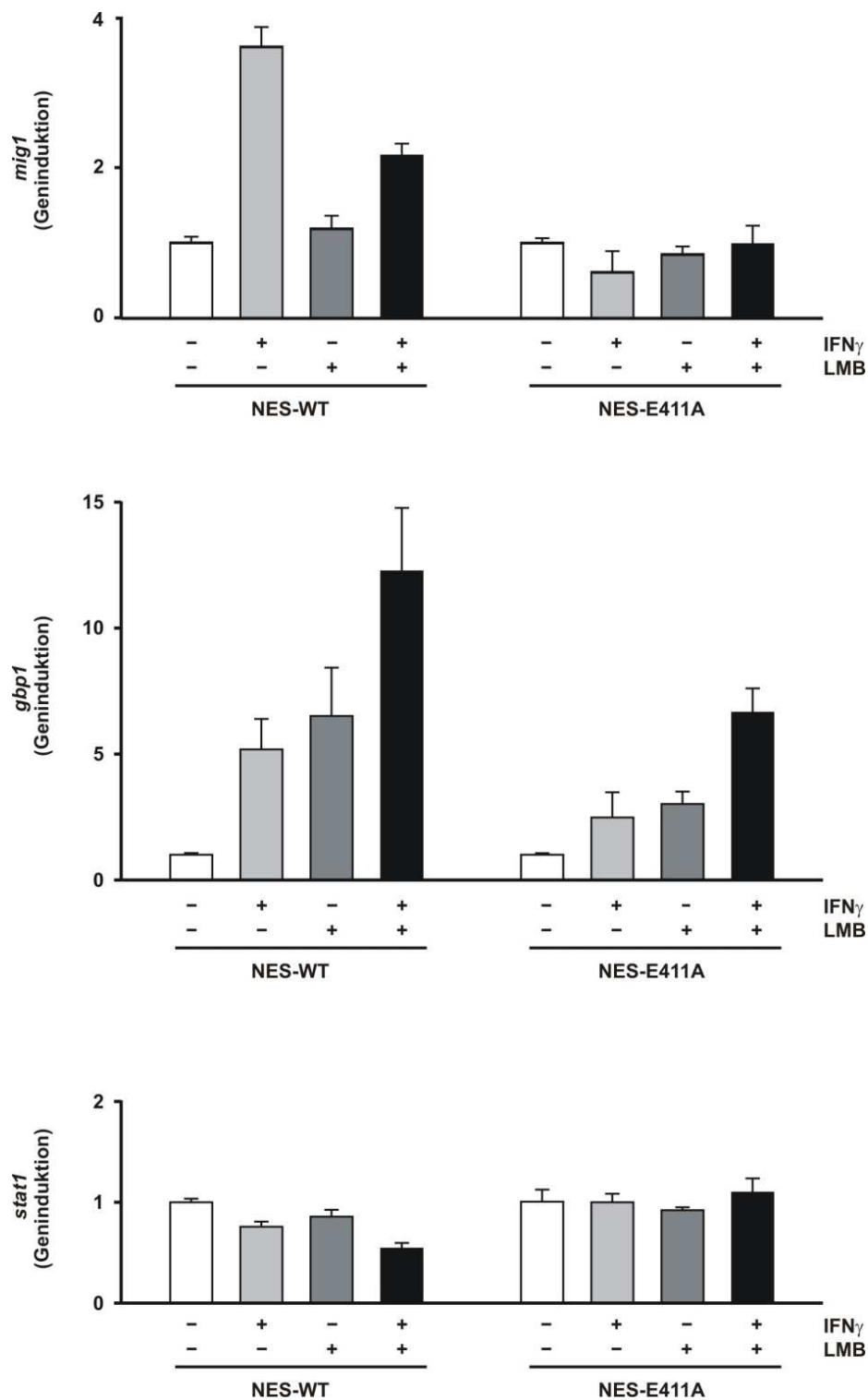


Abb. 24: Eine nukleäre Akkumulation ist für transkriptionelle Aktivität entbehrlich.

U3R-Zellen, die STAT1-NES-GFP bzw. die Doppelmutante mit E411A (STAT1-NES-E411A-GFP) exprimierten, wurden über Nacht in Medium mit 1% FBS kultiviert und anschließend wie angegeben mit 5 ng/mL IFN γ bzw. 10 ng/ml LMB behandelt. Die Stimulationen wurden für 6h durchgeführt. RNA wurde isoliert, cDNA hergestellt und anschließend mittels Real-Time-PCR die Expression der mRNA der Gene *stat1*, *mig1* und *gbp1* analysiert. Die Genaktivierung wurde auf das Expressionsniveau von *gapdh* normalisiert.

Nach Ausschaltung des beschleunigten nukleären Exports durch LMB wurde ebenfalls eine detektierbare transkriptionelle Aktivität registriert. Durch Kostimulation mit IFN γ und LMB konnte kein verstärkender Effekt auf die Expression des Zielgens *mig1* beobachtet werden, dagegen aber für das *gbp1*-Gen. Der Promotor für das *mig1*-Gen besteht aus einer Tandem-GAS-Stelle im Abstand von 25 bp. Der *gbp1*-Promoter besteht dagegen nur aus einer einfachen GAS-Stelle. Die Doppelmutante mit der zusätzlichen Mutation E411A zeigte dagegen einen dramatischen Verlust der Zielgenaktivierung. Trotz verbesserter Kernakkumulation durch IFN γ -Stimulation konnte keine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität gegenüber STAT1-NES-GFP erzielt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass eine hohe Dissoziationsrate von DNA essentiell für eine effektive Genaktivierung ist.

5.8 Aminoternale Punktmutanten als Werkzeuge zum Studium von DNA-Bindung

Neben der direkten Kontaktierung von DNA, vermittelt über die DNA-Bindedomäne und die Linkerdomäne, die beide zur Bindung dimeren STAT1-Proteins beitragen, hat auch der Aminoterminus eine wichtige Rolle bei der Bindung von STAT-Tetrameren. Von Xu et al. (1996) und Vinkemeier et al. (1996) wurde gefunden, dass eine kooperative Bindung an DNA für eine effektive Zielgenaktivierung nötig ist. Eine aminoternale Punktmutante mit defizienter kooperativer DNA-Bindung (F77A) zeigte einen weitgehenden Verlust der Aktivierung von Zytokin-abhängigen Genen (Meyer et al., 2004). Demgegenüber ist eine STAT1-Mutante mit verbesserter kooperativer DNA-Bindung bislang noch nicht beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mutanten generiert, die diese Eigenschaft erfüllen und eine verbesserte kooperative DNA-Bindung eingehen. Diese Mutanten erwiesen sich als nützliche Werkzeuge zur Untersuchung des DNA-Bindevhaltens.

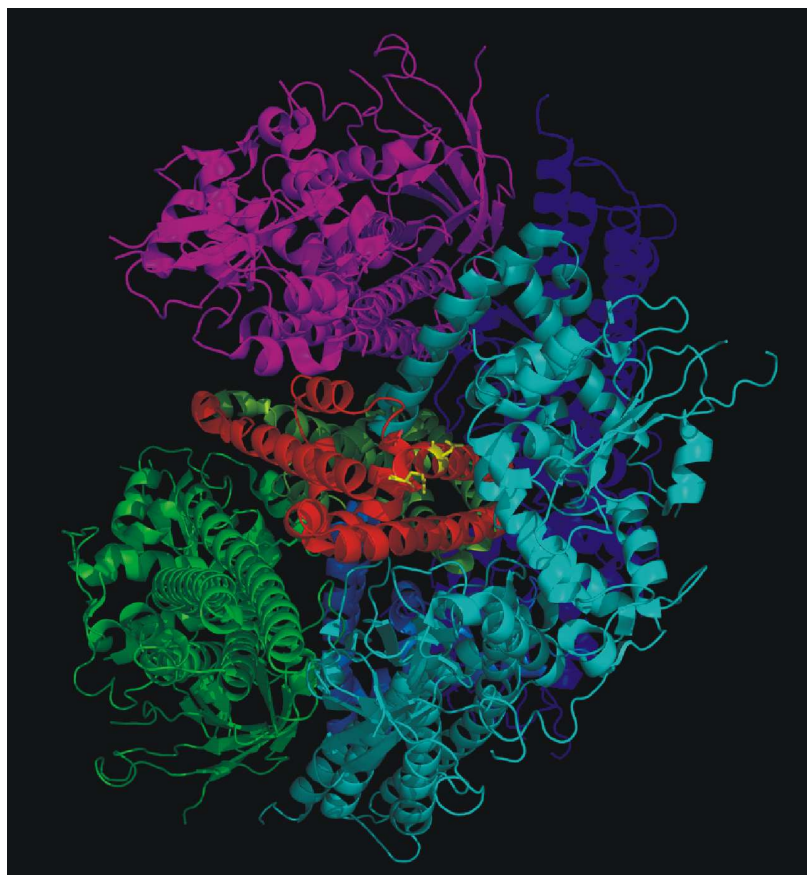


Abbildung 25: Lokalisation der Aminosäuren D92 und E96 in der nicht-DNA-gebundenen Tetramerstruktur von STAT1.

In roter Farbe dargestellt ist einer der vier Aminotermi im STAT1-Tetramer. Gelb markiert sind die Aminosäurereste in den Positionen 92 (oben) und 96 (unten). Die Abbildung wurde mit dem Software-Programm PyMOL anhand des Protein-Data-Bank-(PDB)-Koordinatendatensatzes 1YVL erstellt

Die beiden Punktmutationen liegen in der N-Domäne an den Positionen 92 und 96, dazu wurden die beiden negativ geladenen Aminosäurereste gegen Arginin ausgetauscht. Beide Aminosäuren sind in der humanen STAT-Familie nicht konserviert (**Tab. 5**).

Tab. 5: Sequenzvergleich von homologen Bereichen auf der N-Domäne in humanen STAT-Proteinen.

Die Asparaginsäure an Position 92 und die Glutaminsäure an Position 96 von STAT1 sind in der humanen STAT-Proteinfamilie nicht konserviert.

STAT1	88	R	N	L	Q	D	N	F	Q	E	D	P	I	Q	M	S	M	I	I
STAT2	92	R	D	I	Q	P	.	F	S	Q	D	P	T	Q	L	A	E	M	I
STAT3	88	Q	F	L	Q	S	R	Y	L	E	K	P	M	E	I	A	R	I	V
STAT4	88	K	V	L	Q	G	K	F	H	G	N	P	M	H	V	A	V	V	I
STAT5a	92	T	Q	L	Q	K	T	Y	D	R	C	P	L	E	L	V	R	C	I
STAT5b	92	T	Q	L	Q	N	T	Y	D	R	C	P	M	E	L	V	R	C	I
STAT6	83	.	T	L	E	S	I	Y	Q	R	D	P	L	K	L	V	A	T	F

5.9 Zwei Punktmutationen in der N-Domäne resultieren in einer verbesserten kooperativen DNA-Bindung

Um die Auswirkungen der beiden Punktmutationen D92R und E96R auf die kooperative DNA-Bindung zu untersuchen, wurden EMSA-Analysen durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche [32 P]-markierte Sonden eingesetzt: eine einfache GAS-Stelle (M67), eine zweifache GAS-Stelle (2xGAS), eine GAS-Stelle gekoppelt mit einer Non-GAS-Stelle (GAS-nonGAS) und zwei miteinander gekoppelte Non-GAS-Stellen (2xnonGAS). Für die Analysen wurden Gesamtzellextrakte aus U3R-Zellen, welche GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierten, nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation mit den jeweiligen Sonden inkubiert. Wie in **Abb. 26** zu sehen, zeigte sich an der M67-DNA ein dimerer STAT1-DNA-Komplex (unterer Pfeil) bei allen drei STAT1-Varianten, ebenso wie an der GAS-nonGAS-Sonde. Dort fällt deutlich ein zusätzlicher tetramerer STAT1-DNA-Komplex (oberer Pfeil) der beiden Punktmutanten D92R und E96R auf. An der 2xnonGAS-Sonde bindet keine der drei STAT1-Varianten.

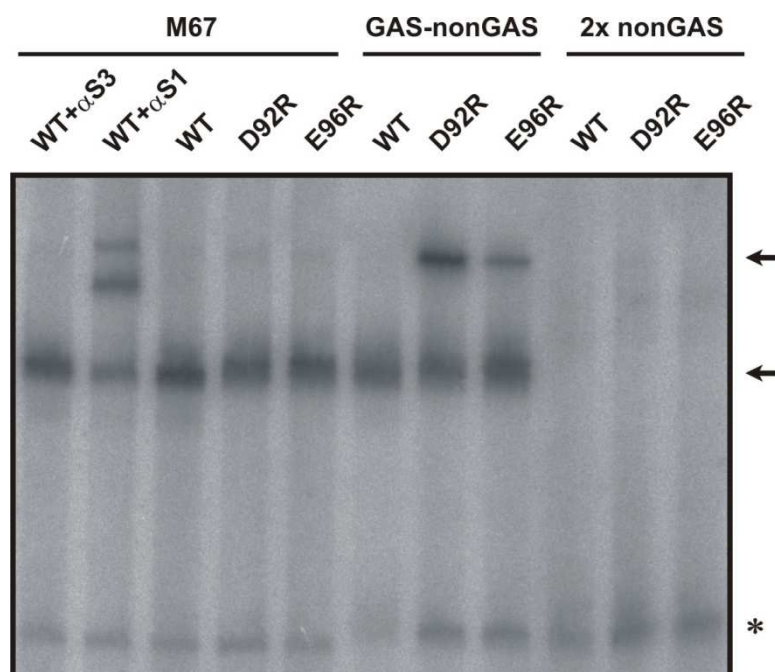


Abb. 26: Tetramerbildung an einer GAS-nonGAS-Sonde von STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP im Gelshift-Experiment.

Nach 45 Min. Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierenden U3R-Zellen hergestellt und wie angegeben mit den jeweiligen [32 P]-markierten Sonden inkubiert. Verwendet wurden eine einfache GAS-Stelle (M67), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle im Tandem (GAS-nonGAS) und eine zweifache Non-GAS-Stelle (2xnonGAS). Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. Der untere Pfeil markiert die dimeren STAT1-DNA-Komplexe und der obere die tetrameren STAT1-DNA-Komplexe. αS1 bezeichnet einen

Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper. α S3 zeigt einen Supershift nach Zugabe eines STAT3-spezifischen Antikörpers. Der Stern gibt eine unspezifische Bindung an.

Zur Überprüfung der Stabilität des tetrameren STAT1-DNA-Komplexes wurde ein Kompetitionsgelelshift durchgeführt. Dazu wurden die Gesamtzellextrakte aus STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierenden U3R-Zellen nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation mit einer [32 P]-markierten 2xGAS-Sonde für 15 Min. vorinkubiert und danach für 30 Min. mit der unmarkierten M67-DNA im 750-fachen molaren Überschuss kompetitiert. Wie in **Abb. 27** gezeigt, blieben die Tetramerbanden (obere Pfeile) bei den Punktmutanten bestehen, während die Dimerbanden (untere Pfeile) verschwanden, STAT1-WT zeigte den gleichen Phänotyp.

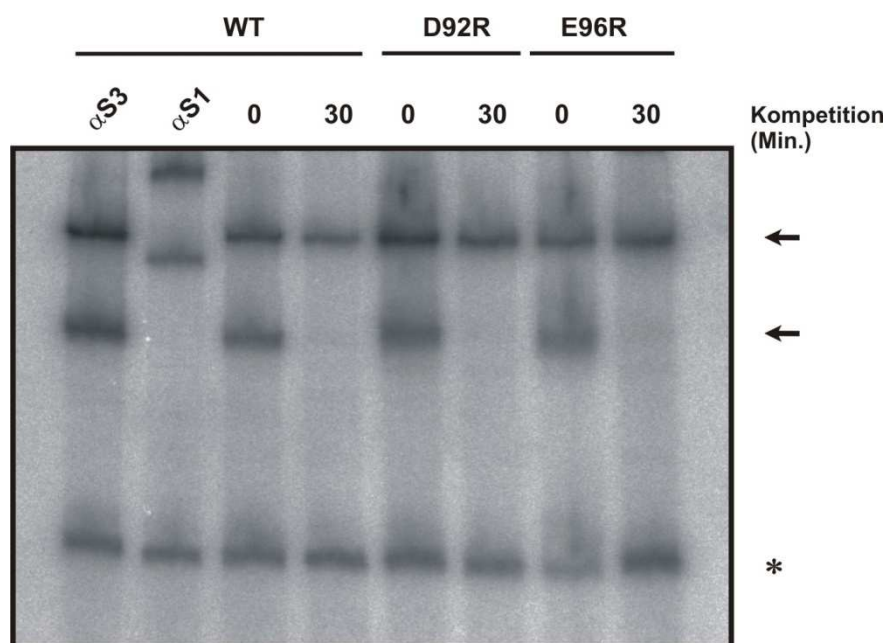


Abb. 27: STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP zeigen im EMSA-Experiment eine normale Kompetition an einer 2xGAS-Stelle.

STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend Gesamtzellextrakte hergestellt. Nach einer Inkubation für 15 Min. mit [32 P]-markierter 2xGAS-Sonde wurde ein 750-facher Überschuss von nicht-radioaktiv markierter M67-DNA für 30 Min. zugegeben. Danach folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. Der untere Pfeil markiert die dimeren STAT1-DNA-Komplexe, der obere die tetrameren STAT1-DNA-Komplexe. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper und α S3 einen Supershift nach Zugabe eines STAT3-spezifischen Antikörpers. Der Stern markiert eine unspezifische Bindung.

Um auszuschließen, dass die zusätzlichen STAT1-Tetramerbanden der beiden Mutanten an der GAS-nonGAS-Sonde aufgrund einer höheren Konzentration der Mutanten zustande kommen, wurden unterschiedliche Extraktmengen eingesetzt. Wie

präsentiert, zeigte sich schon bei Zugabe einer Extraktmenge von 1,5 µl ein tetramerer STAT1-DNA-Komplex (oberer Pfeil), bei STAT1-WT zeigte sich dagegen auch bei 4,5 µl Gesamtzellextrakt keine Tetramerbande (**Abb. 28**). Anhand dieser Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass die Tetramerbildung aufgrund hoher STAT1-Konzentration stattfindet.

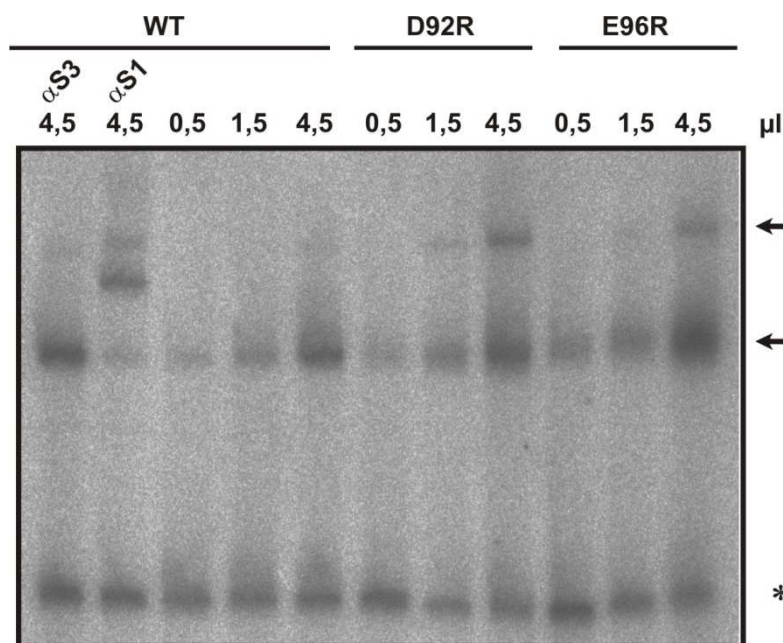


Abb. 28: Tetramerbildung an einer GAS-nonGAS-Sonde von STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP schon bei geringen Konzentrationen von phosphoryliertem STAT1.

STAT1-WT-GFP, -D92R-GFP und -E96R-GFP exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend Gesamtzellextrakte hergestellt. Nach der 15-minütigen Inkubation der angegebenen Extraktmengen mit [32 P]-markierter GAS-nonGAS-Sonde folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. Der untere Pfeil zeigt die dimeren STAT1-DNA-Komplexe, der obere die tetrameren STAT1-DNA-Komplexe. α S1 bzw. α S3 verweisen auf Supershiftreaktionen nach Zugabe eines STAT1- bzw. STAT3-spezifischen Antikörpers. Unspezifische Bindung der Sonde ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Zur näheren Untersuchung des dimeren STAT1-DNA-Komplexes wurden Kompetitionsgelelshifts mit M67-DNA durchgeführt. Dazu wurden die Gesamtzellextrakte aus STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierenden U3R-Zellen nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation mit einer [32 P]-markierten M67-DNA für 15 Min. vorinkubiert und danach 5 bzw. 10 Min. mit unmarkierter M67-DNA auf Eis kompetitiert. Wie in **Abb. 29** gezeigt, verschwinden die Dimerbanden der STAT1-GFP-Fusionsproteine (Pfeil) mit gleicher Kinetik wie die des unmutierten Proteins. Die Mutanten unterschieden sich in diesem Kompetitionsversuch nicht vom WT, sie

haben die gleiche Dissoziationsrate von einer einfachen GAS-Bindestelle wie das Wildtyp-Molekül.

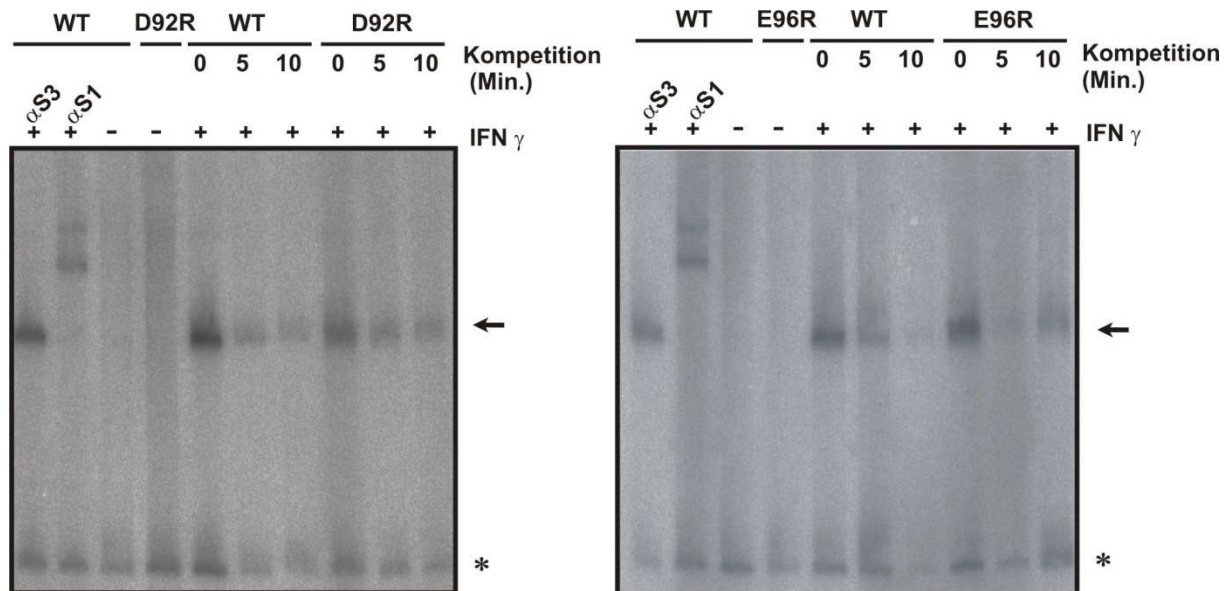


Abb. 29: STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP zeigen eine normale Kinetik der Bindung an M67-DNA.

STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierende U3R-Zellen wurden wie angegeben entweder unstimuliert belassen oder für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Die anschließend isolierten Gesamtzellextrakte wurden nach einer Inkubation für 15 Min. mit [32 P]-markierter M67-DNA mit einem 750-fachen Überschuss von nicht-radioaktiv markierter M67-DNA für die angegebenen Zeiten behandelt. Danach folgte eine elektrophoretische Auftrennung. Der untere Pfeil zeigt die dimeren DNA-gebundenen STAT1-GFP-Komplexe, der obere STAT1-GFP-Tetramere. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper und α S3 einen Supershift nach Zugabe eines STAT3-spezifischen Antikörpers. Der Stern markiert eine unspezifische Bindung.

Von Meyer et al. (2004) wurde eine Mutation im STAT1-Molekül beschrieben, die mit einem Tetramerisierungsdefekt assoziiert ist. Bei dieser Mutante wurde die Aminosäure Phenylalanin in Position 77 gegen Alanin substituiert. Das mutierte Protein kann an 2xGAS-Stellen Tetramere bilden, diese verschwinden in Konkurrenz mit unmarkierter DNA aber schnell wieder als Folge ihrer fehlenden Tetramerstabilisierung. In **Abb. 30** werden die Ergebnisse von EMSA-Analysen präsentiert, die STAT1-F77A mit STAT1-D92R und STAT1-E96R im Vergleich zeigen. Dazu wurden U3R-Zellen, welche die jeweiligen STAT1-GFP-Varianten exprimierten, für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und Zellextrakte davon mit den [32 P]-markierten Sonden M67, GAS-nonGAS und 2xGAS für 15 Min. inkubiert. Wie erwartet bildeten sich an der 2xGAS-Sonde tetramere STAT1-DNA-Komplexe bei allen getesteten STAT1-Varianten. Jedoch fanden sich sowohl für STAT1-D92R wie auch STAT1-E96R tetramerstabilisierende Banden auch an der GAS-nonGAS-Sonde (**Abb. 30**).

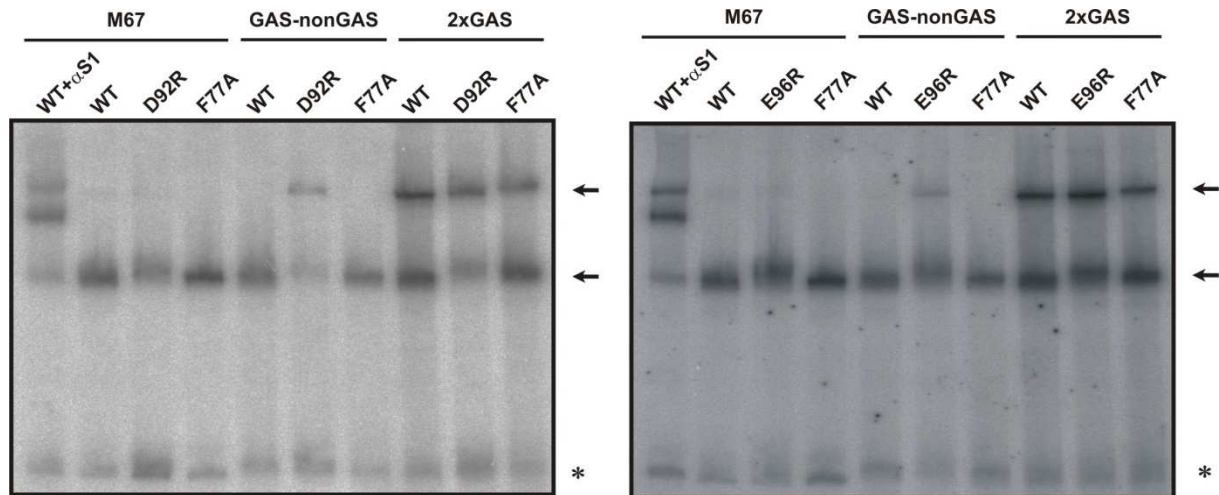


Abb. 30: STAT1-D92R und STAT1-E96R zeigen im Gegensatz zu STAT1-WT und STAT1-F77A an einer GAS-nonGAS-Sonde kooperative DNA-Bindung.

STAT1-WT, -F77A, -D92R und -E96R exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend Gesamtzellextrakte, für 15 Min. mit den jeweils angegebenen [32 P]-markierten Sonden inkubiert. Der untere Pfeil zeigt die dimeren STAT1-DNA-Komplexe, der obere die tetrameren STAT1-DNA-Komplexe nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Supershiftreaktionen in Gegenwart von Anti-STAT1-Antikörpern sind mit α S1 bezeichnet, der Stern verweist auf eine unspezifische Bindung

5.10 STAT1-D92R und STAT1-E96R zeigen eine normale Kinetik der Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation trotz verbesserter kooperativer DNA-Bindung

Als nächstes wurde die Auswirkung der verbesserten Tetramerstabilisierung auf die Kinetik der Kernakkumulation für beide Punktmutanten untersucht. Dazu wurden Expressionsplasmide, die für STAT-GFP-Fusionsproteine von WT, D92R und E96R kodieren, in HeLa-S3-Zellen transfiziert, für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und vor dem Fixieren für unterschiedlich lange Zeiträume mit Staurosporin behandelt. Nach einer Hoechst-Färbung wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Wie in **Abb. 31** zu sehen, unterschied sich die Kernakkumulationsdauer der beiden Punktmutanten nicht von der des Wildtyp-Proteins.

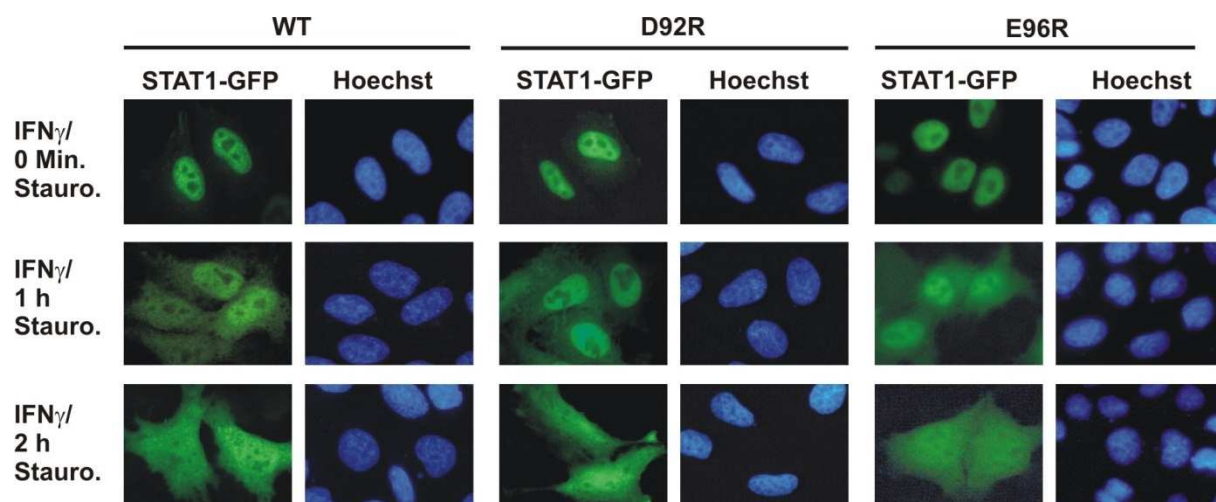


Abb. 31: Normale nukleäre Akkumulationsdauer von STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP. STAT1-WT, -D92R- oder -E96R exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend wie angegeben für 0, 1 oder 2 Stunden mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt. Gezeigt sind die intrazelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz und die korrespondierenden Kernfärbungen in den fixierten Zellen.

Diese Versuche wurden zusätzlich mit den pcDNA3.1-STAT1-Derivaten durchgeführt, um Artefakte durch die Fusion mit GFP auszuschließen. Die Detektion der STAT1-Proteine erfolgte immuncytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper. Die ungekoppelten STAT1-Varianten unterschieden sich auch in diesem Versuch in der Kernakkumulationsdauer nicht von STAT1-WT (**Abb. 32**).

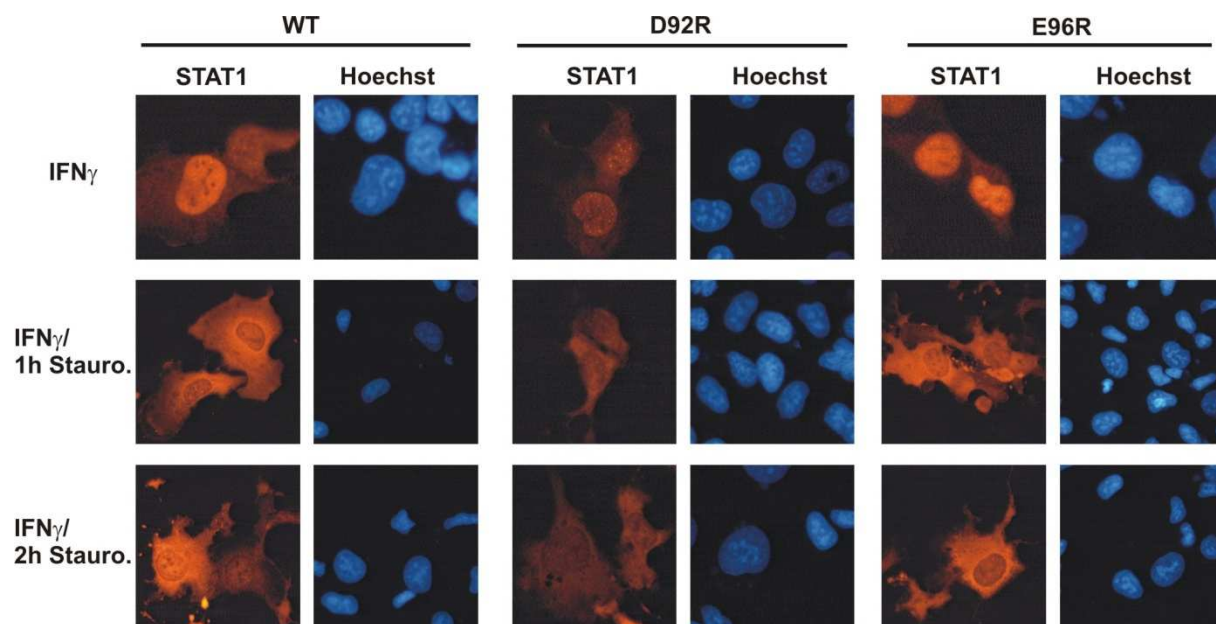


Abb. 32: Normale Kinetik des Staurosporin-induzierten Zusammenbruchs des kernakkumulierten Zustands bei den STAT1-Mutanten D92R und E96R.

STAT1-WT, -D92R oder -E96R exprimierende U3R-Zellen wurden nach 45-minütiger Behandlung mit 5 ng/mL IFN γ für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Nach Fixierung der Zellen mit kaltem Methanol bei -20°C wurde die STAT1-Lokalisation immuncytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper detektiert und die Zellkerne mit Hoechst gegengefärbt.

5.11 Verbesserte kooperative DNA-Bindung von STAT1-D92R und STAT1-E96R führt *in vivo* zu einer Hyperphosphorylierung und *in vitro* zu einer schnelleren Dephosphorylierung

Um zu untersuchen, ob die verbesserte Tetramerstabilisierung einen Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung und die Dephosphorylierungskinetik hat, wurden *In-vivo*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit den jeweiligen pSTAT1-GFP-Derivaten transfiziert, am Folgetag für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und für 0 bis 45 Min. mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und davon Western-Blot-Analysen durchgeführt. Wie in **Abb. 33** zu sehen, waren die beiden Mutanten STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP hyperphosphoryliert.

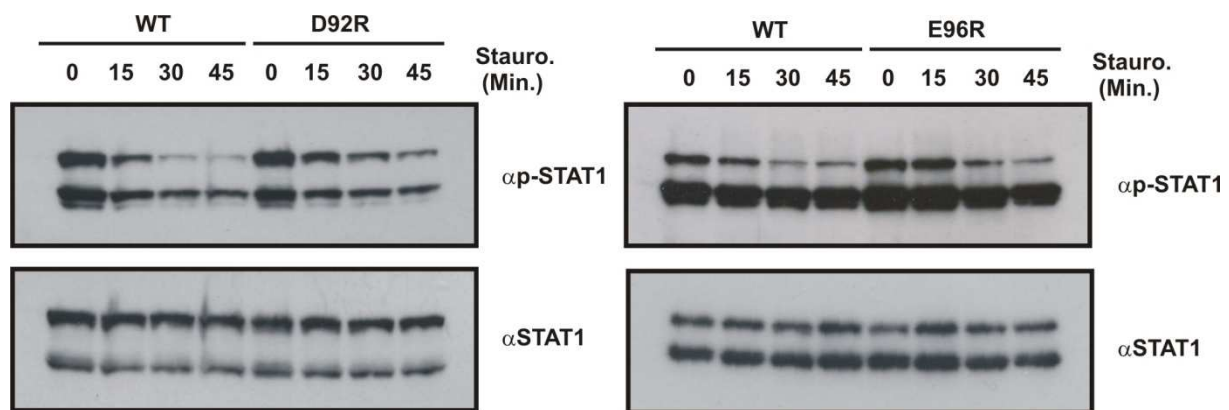


Abb. 33: Hyperphosphorylierung von STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP.

STAT1-WT, -D92R oder -E96R exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden nach vorheriger 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ nachfolgend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und diese anschließend in Western-Blot-Analysen untersucht. Die oberen Felder zeigen Western-Blots mit Phospho-STAT1-Antikörper. In den unteren Feldern sind dieselben Blot-Membranen nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt. Die jeweils oberen Banden zeigen die STAT1-GFP-Fusionsproteine, die unteren Banden markieren endogenes STAT1.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die nukleären und cytoplasmatischen Verteilungen der beiden STAT1-Punktmutanten vom WT unterscheiden. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen wie im vorherigen Versuch transfiziert, 24 h später mit IFN γ stimuliert und nachfolgend mit Staurosporin behandelt. Cytoplasmatische und nukleäre Extrakte wurden isoliert und mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Wie in **Abb. 34** gezeigt, war sowohl in cytoplasmatischen wie in nukleären Extrakten eine deutliche Hyperphosphorylierung von STAT1-D92R-GFP zu erkennen. Auch nach 45-minütiger Staurosporin-Behandlung war in beiden Fällen noch phosphoryliertes Protein detektierbar, bei STAT1-WT-GFP dagegen schon nach 30-minütiger Behandlung

nicht mehr. Im Fall von STAT1-E96R-GFP zeigte sich eine deutliche Hyperphosphorylierung im Zellkern.

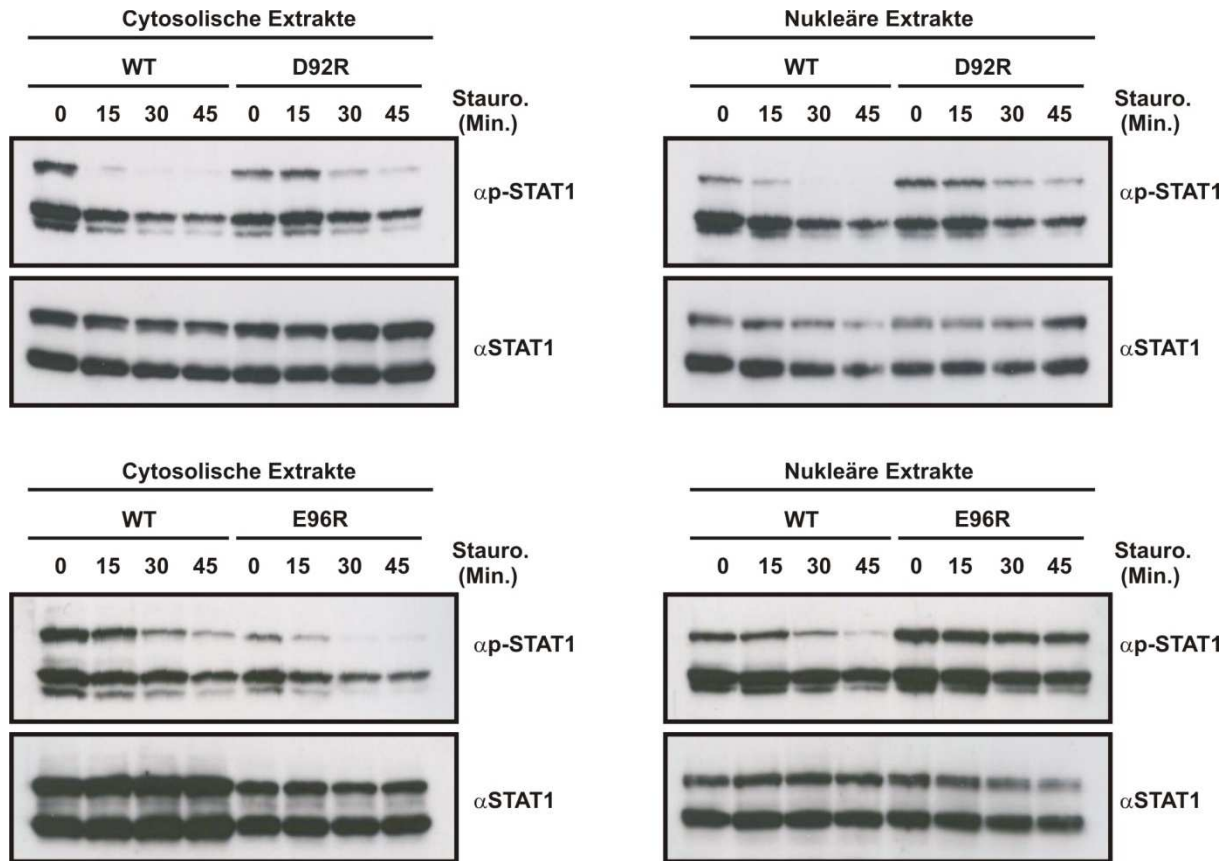


Abb. 34: Hyperphosphorylierung von STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP.

STAT1-WT, -D92R und -E96R exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ mit 1 μ M Staurosporin für die angegebenen Zeiten inkubiert. Cytoplasmatische und nukleäre Zellextrakte wurden isoliert und diese in Western-Blot-Analysen untersucht. Die oberen Felder zeigen die Western-Blots mit Phospho-STAT1-Antikörper, in den unteren Feldern sind dieselben Blot-Membranen nach Entfernen der Antikörper und erneuter Inkubation mit einem STAT1-spezifischen Antikörper gezeigt. Die jeweils oberen Banden zeigen die STAT1-GFP-Fusionsproteine, die unteren Banden markieren endogenes STAT1.

Als nächstes wurde eine *In-vitro*-Dephosphorylierung durchgeführt, um den Einfluss der Tetramerbildung auf die Dephosphorylierung zu untersuchen. In dimerer Form zeigen die STAT1-Mutanten keine gesteigerte DNA-Bindung, somit nehmen diese keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis. Wieder wurden U3R-Zellen mit den jeweiligen pSTAT1-GFP-Derivaten transfiziert, für 45 Min. mit IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte isoliert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 0 bis 30 Min. mit TC-PTP gefolgt von einer Western-Blot-Analyse zu Darstellung des Dephosphorylierungsergebnisses. In **Abb. 35** ist die Dephosphorylierungskinetik der

beiden Mutanten im Vergleich zum WT gezeigt und man kann eine schnellere Dephosphorylierung von STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP erkennen.

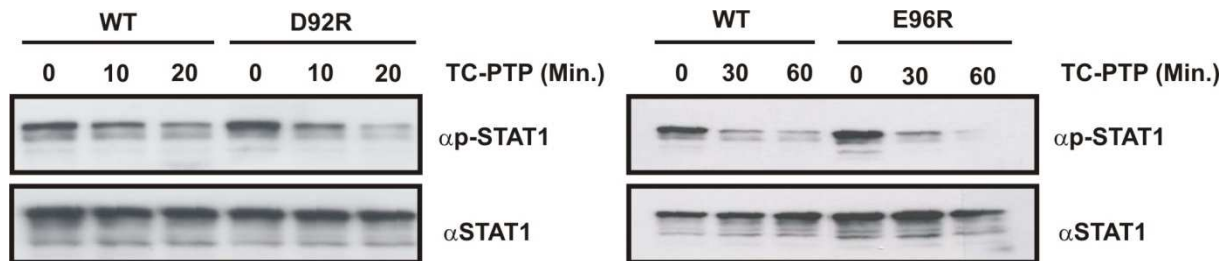


Abb. 35: STAT1-D92R-GFP und STAT1-E96R-GFP zeigen *in vitro* eine höhere Dephosphorylierungskinetik als STAT1-WT-GFP.

Aus STAT1-WT, -D92R und E96R exprimierenden U3R-Zellen wurden nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation (5ng/mL) Gesamtzellextrakte isoliert. Diese wurden anschließend für die angegebenen Zeiten mit T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase bei 30°C inkubiert und in Western-Blot-Analysen untersucht. Die oberen Felder zeigen die Western-Blots mit Phospho-STAT1-Antikörper und in den unteren Feldern dieselben Blot-Membranen nach Entfernen der Antikörper und Reinkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper.

Das gleiche Experiment wurde mit der STAT1-F77A-GFP-Mutante durchgeführt. Diese verhält sich bezüglich der Tetramerisierung zu den STAT1-D92R und STAT1-E96R-Mutanten gegensätzlich. In der *In-vitro*-Dephosphorylierung ließ sich diese Mutante im Gegensatz zu STAT1-WT und den beiden Mutanten in **Abb. 35** nicht dephosphorylieren (**Abb. 36**). Deutlich erkennbar ist auch die starke Hyperphosphorylierung der STAT1-F77A-Mutante.

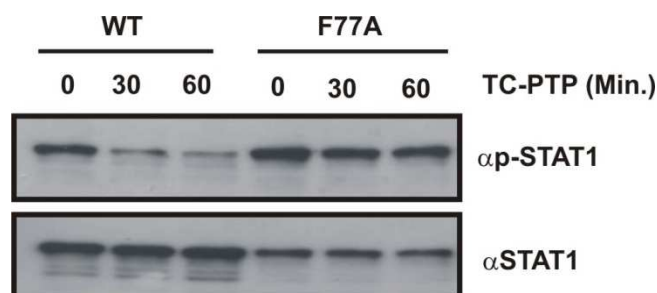


Abb. 36: STAT1-F77A-GFP zeigt *in vitro* eine deutliche Dephosphorylierungsresistenz.

STAT1-WT-GFP und STAT1-DF77A-GFP exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 Min. mit 5 ng/mL IFN γ inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden für die angegebenen Zeiten mit T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase bei 30°C inkubiert und anschließend in Western-Blot-Analysen untersucht. Gezeigt ist das Ergebnis eines Western-Bots mit Anti-Phospho-STAT1-Antikörper (oben) und nach Reexposition mit einem STAT1-spezifischen Antikörper (unten).

5.12 Die verbesserte kooperative DNA-Bindung führt zu einer besseren transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen mit Mehrfach-GAS-Stellen

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass verbesserte kooperative DNA-Bindung vor Dephosphorylierung durch die STAT1-spezifische Phosphatase schützt. Um die Auswirkung dieses Phänotyps auf die transkriptionelle Aktivität zu untersuchen, wurden zunächst Reporterassays durchgeführt. Dazu wurde ein Luciferase-Reporter mit einem synthetischen Promotor bestehend aus drei GAS-Stellen im Abstand von je 10 bp eingesetzt. Wie in **Abb. 37** ersichtlich, zeigten die in U3R-Zellen exprimierten STAT1-D92R-GFP- und STAT1-E96R-GFP-Mutanten eine um mehr als 50 % verbesserte transkriptionelle Antwort nach 6-stündiger IFN γ Stimulation als STAT1-WT-GFP.

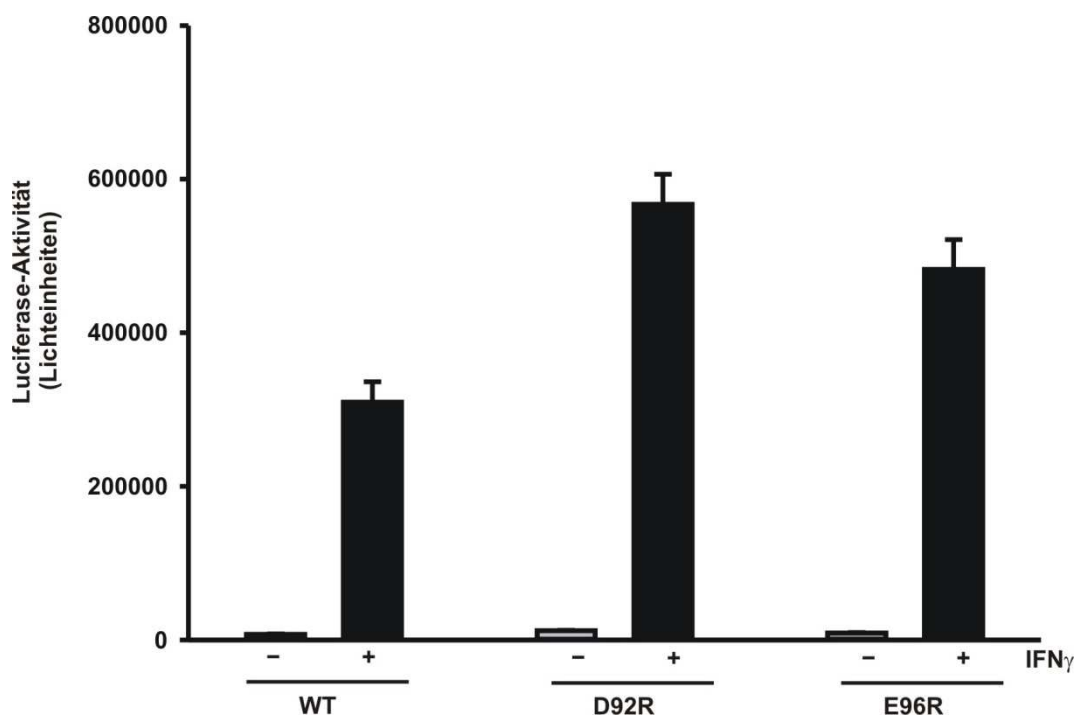


Abb. 37: Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-D92R und STAT1-E96R ist im Reporterassay an einem synthetischen Promotor mit dreifacher GAS-Stelle verbessert.

U3R-Zellen wurden mit pSTAT1-GFP-Plasmiden, die für STAT1-WT, -D92R und -E96R kodieren, sowie p β Gal und pGAS3xLy6E transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder nicht oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Anschließend wurden in Zellextrakten die Luciferase-Aktivität sowie die β -Galactosidase-Aktivität gemessen und auf letztere normiert.

Zusätzlich zu den Reporteragenassays mit einem Promotor mit dreifacher GAS-Stelle wurden Assays mit zwei Luciferase-Reportern durchgeführt, welche den Volle-Länge (pIC-1352) bzw. trunkierten (pIC-339) Promotor des humanen ICAM-1-Gens enthielten (Hou et al., 1994; Van de Stolpe et al., 1994). In diesen Promotoren befindet sich eine einfache GAS-Bindestelle.

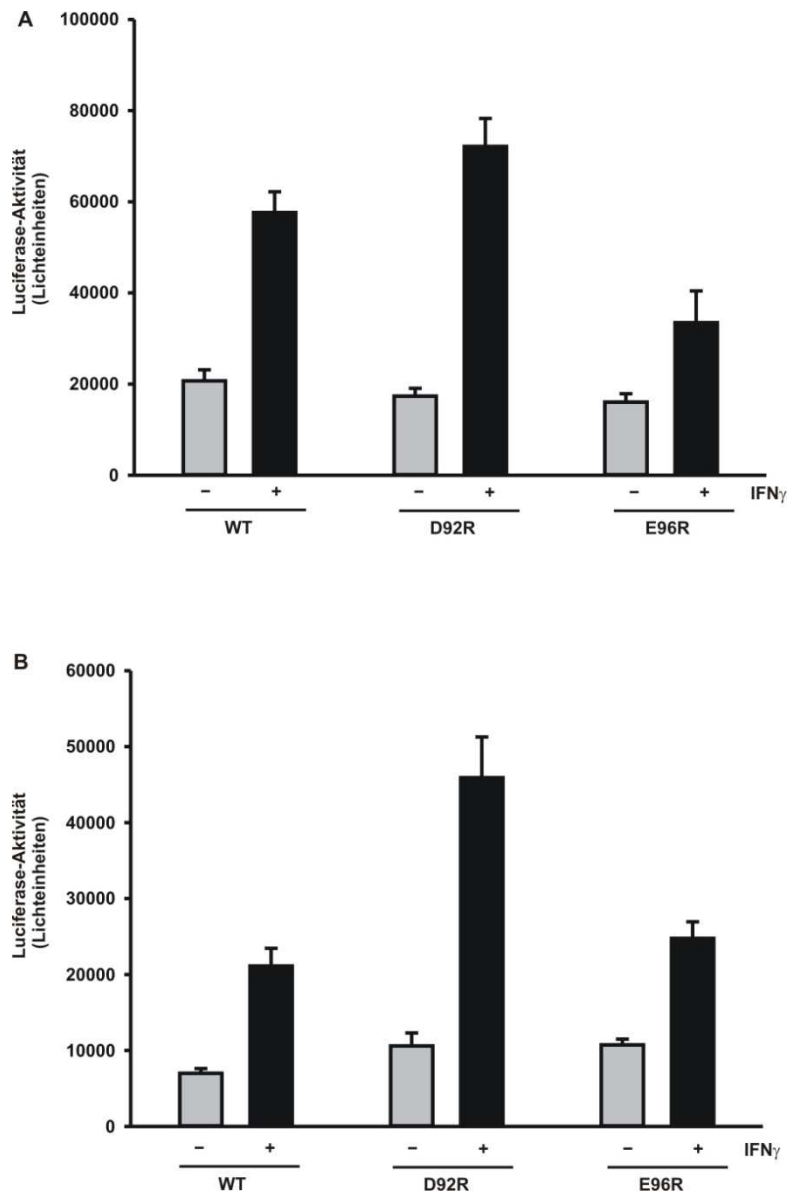


Abbildung 38: Unterschiedliche transkriptionelle Aktivität der STAT1-Mutanten D92R und E96R an nativen Promotoren mit singularer GAS-Stelle im Reporteragenassay.

(A) U3R-Zellen wurden mit STAT1-WT-GFP, -D92R-GFP -E96R-GFP sowie den Plasmiden p β Gal und pIC-339 transfiziert, am nächsten Tag zum Teil mit 5 ng/mL IFN γ für 6 h stimuliert und anschließend Zellextrakte hergestellt. Nach dem Luciferase-Assay wurde auf die Aktivität der β -Galactosidase normiert. Es wurden jeweils 6-fach Bestimmungen durchgeführt. (B) 16 h nach Transfektion von U3R-Zellen mit den Plasmiden pSTAT1-WT, -D92R, -E96R, p β Gal und pIC-1352 wurde die Hälfte der Zellen für 6 h mit IFN γ (5 ng/mL) stimuliert. Nach der Isolation von Zellextrakten wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt und die Werte auf die β -Galactosidase-Aktivität normiert.

Am Tag nach der Transfektion von U3R-Zellen mit den pSTAT1-Plasmiden für WT, D92R und E96R sowie den Plasmiden p β Gal, pIC-339 und pIC-1352 wurden die Zellen in 6-fach Bestimmung entweder für 6 h mit IFN γ stimuliert oder unbehandelt belassen. In den anschließend isolierten Zellextrakten wurde die Luciferase-Aktivität gemessen und nach der Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität auf diese berechnet. Die aminoterminal Mutante D92R zeigte an beiden Promotoren eine erhöhte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die zweite aminoterminal Punktmutante E96R war dem Wildtyp am trunkierten Promotorfragment transkriptionell unterlegen bzw. am Volle-Länge-Promotor gleichwertig.

Um die transkriptionelle Aktivität an natürlichen Promotoren genauer zu untersuchen, wurden Real-Time-RT-PCR-Analysen mit pcDNA3.1-STAT1-transfizierten U3R-Zellen von drei endogenen, IFN γ -induzierbaren Genen und als Kontrolle dem *stat1*-Gen zur Überprüfung der stattgefundenen Transfektion durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 h nach Transfektion in Medium mit 1% FBS kultiviert. Nach weiteren 15 h erfolgte eine IFN γ -Stimulation für 6 h oder die Zellen wurden alternativ unstimuliert belassen. Aus **Abb. 39** kann man ersehen, dass die *stat1*-mRNA-Expression in allen Proben detektierbar war. Die Zielgene *irf1* und *gbp1* wurden in allen transfizierten U3R-Zellen gleich stark exprimiert, mit Ausnahme von *irf1* bei STAT1-E96R. In diesem Fall fiel die transkriptionelle Aktivität schwächer aus als bei STAT1-WT. Die *mig1*-Expression in den STAT1-D92R- und STAT1-E96R-transfizierten Zellen war gegenüber STAT1-WT-exprimierenden Zellen erhöht.

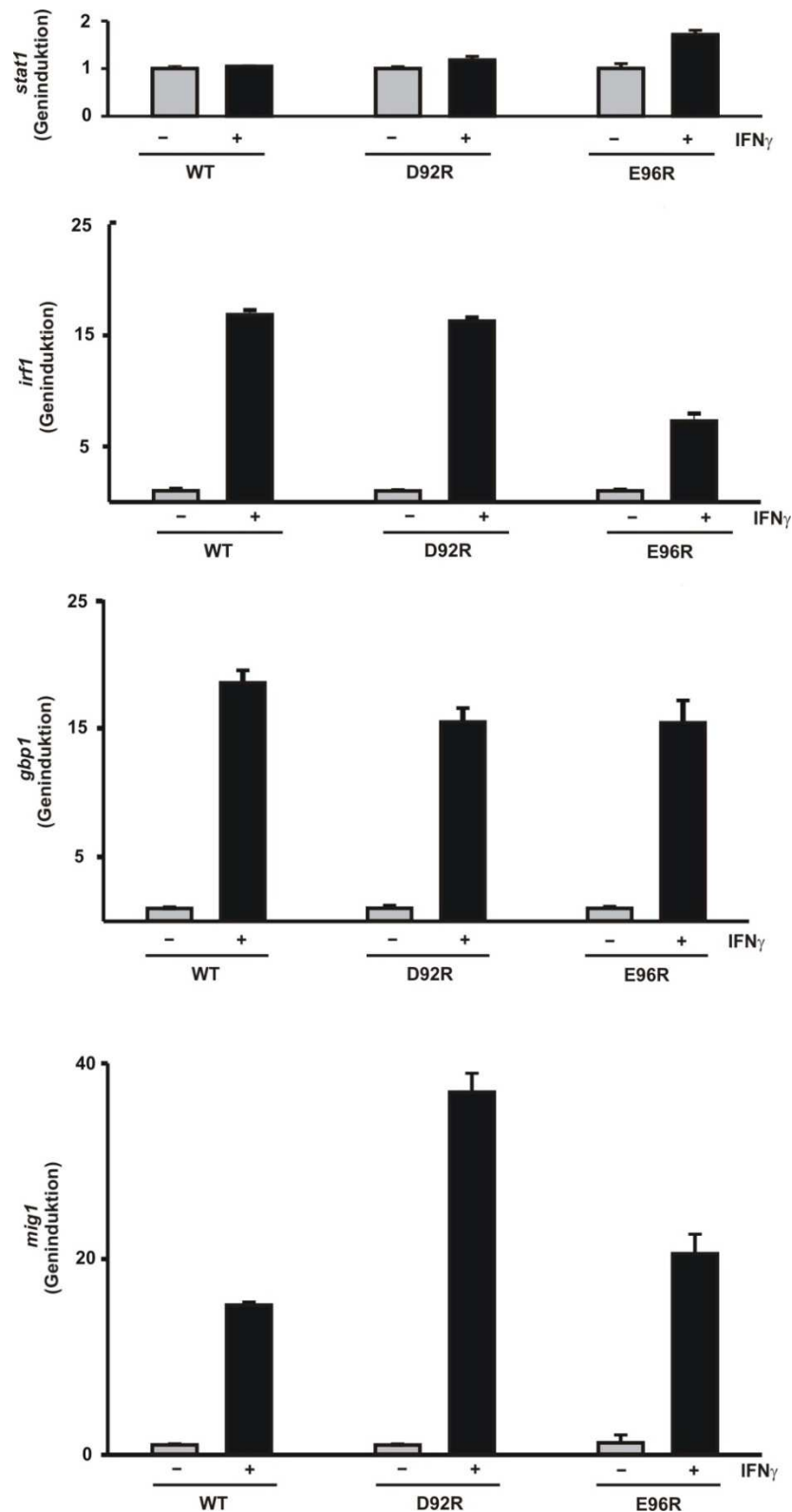


Abb. 39: Differentielle Genexpression nativer Zielgene von STAT1 durch die aminoterminalen Mutanten D92R und E96R in Real-Time-RT-PCR Versuchen.

U3R-Zellen wurden mit den entsprechenden pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden transfiziert, 24 h nach Transfektion wurde das Vollmedium gegen Medium mit 1% FBS ausgetauscht und 15 h später wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder mit IFN γ für 6 h stimuliert. RNA wurde isoliert, davon cDNA hergestellt und anschließend mittels Real-Time-PCR die Zielgene *stat1*, *irf1*, *mig1* und *gbp1* analysiert. Die Genaktivierung wurde auf die jeweiligen Messwerte von *gapdh* normalisiert.

Auffällig ist, dass im Reportergenassay an einem Promotor mit dreifacher GAS-Stelle und am Promotor für *mig1* eine bessere Zielgenaktivierung erreicht wurde.

5.13 Ergebnisse der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen-Analyse

Da die in dieser Arbeit erstmalig identifizierten DNA-Bindemutanten ein abweichendes transkriptionelles Verhalten aufwiesen, wurde im letzten Teil des Forschungsprojektes gezielt nach solchen Mutationen in Patienten mit inflammatorischen oder malignen Erkrankungen stichprobenhaft gefahndet. Bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) wird bei einigen Subentitäten eine Immunogenose diskutiert; wobei eine Phosphorylierung von STAT1 beteiligt sein soll (Ng et al., 2002). Deshalb wurde in dieser Arbeit genomische DNA von 235 Patienten mit DCM auf Mutationen im Exon 15 des STAT1-Gens mittels Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen-Analyse (SSCP) untersucht. Dieses Exon umfasst den Bereich der Aminosäuren 408-421 des STAT1-Gens und beinhaltet somit zwei der bisher charakterisierten STAT1-Mutanten. Dabei konnte eine stille Mutation in einer Patienten-Probe im kodierenden Bereich der AS 416 gefunden werden. Anstelle eines Cytidins wurde ein Guanotin identifiziert. Dies zeigt sich in einem Bandenshift, wie in **Abb. 40** zu sehen ist.

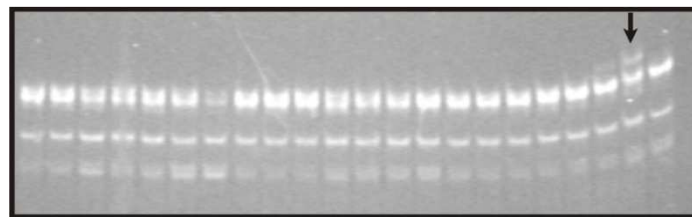


Abb. 40: Bandenshift in der SSCP-Analyse des Exons 15 von STAT1 in genomischer DNA eines DCM-Patienten.

Genomische DNA von 22 DCM-Patienten wurde mittels PCR amplifiziert und über SSCP analysiert. Gezeigt ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes SSCP-Gel im UV-Licht. Der Pfeil verweist auf einen Bandenshift als Folge einer Nukleotidsubstitution bei Patient 21.

Die Punktmutation wurde (Pfeil in **Abb. 41**) durch Sequenzierung bestätigt. Die beiden benachbarten Proben wurden ebenfalls sequenziert und zeigten keine Mutation.

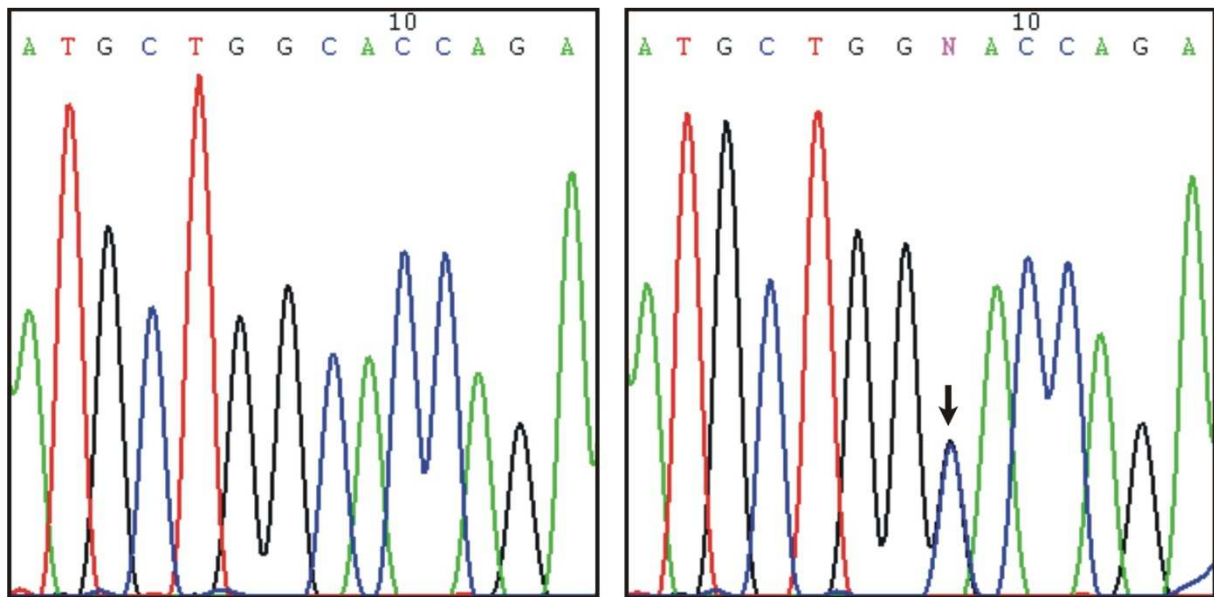


Abb. 41: Sequenzierungen ohne (links) und mit heterozygoter (rechts) Mutation des Exons 15 von STAT1.

Auf der rechten Seite ist die Sequenzierung der PCR-Probe, welche zuvor einen Bandenshift ergeben hatte, zu sehen. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und mittels modifizierter Didesoxynukleotid-Methode sequenziert. Blau zeigt Cytidin an, schwarz Guanotin. Da die Mutation heterozygot auftritt sieht man Cytidin sowie Guanotin übereinander, dabei zeigt das Cytidin verglichen mit den homozygoten Cytidinen nur die halbe Höhe des Signals. Links ist die Sequenzierung des PCR-Produkts einer Patienten-DNA ohne Mutation gezeigt.

Zusätzlich wurde genomische DNA aus peripherem Blut bzw. aus Knochenmark von neun Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und von elf Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf Punktmutationen im STAT1-Gen in sechs unterschiedlichen Exons mittels SSCP analysiert. Keine der Proben zeigte einen Bandenshift, es konnte somit keine Mutation nachgewiesen werden.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Charakterisierung von DNA-Bindemutanten des Transkriptionsfaktors STAT1 der Einfluss einer verbesserten spezifischen Promotorerkennung auf die Signalweiterleitung und transkriptionelle Aktivierung untersucht. Von allen STAT-Proteinen ist die von STAT1-vermittelte Signalverarbeitung wohl am besten, wenngleich immer noch fragmentarisch, bekannt. In dieser Arbeit wurden STAT1-Mutanten generiert, die weitere kinetische Untersuchungen zur Regulation dieses Signalweges ermöglichten.

Bisher wurde der Einfluss einer verbesserten STAT1-Bindung an DNA bei erhaltener GAS-Stellen-Erkennung bezüglich der transkriptionellen Zielgenaktivierung nicht systemisch erforscht. Solche STAT1-Mutanten mit diesen Eigenschaften wären zur Aufklärung der STAT1-Signaltransduktion im Hinblick auf nukleocytoplasmatisches Shuttling, Promotorerkennung und Genaktivierung sehr hilfreiche Werkzeuge. In dieser Arbeit ist es uns gelungen, mehrere STAT1-Mutanten mit diesen Eigenschaften zu generieren. Damit war es möglich, die transkriptionellen Konsequenzen einer verbesserten Dimerbindung bzw. Tetramerstabilisierung an GAS-Stellen auf zellulärer Ebene zu bestimmen. Um die biologischen Effekte von verstärkter STAT1-DNA-Interaktion zu charakterisieren, wurden Punktmutationen in der STAT1-cDNA von Expressionsplasmiden eingeführt und die daraus resultierenden Mutanten auf ihre DNA-Bindefähigkeiten und transkriptionellen Aktivitäten untersucht. Die meisten bisher beschriebenen Mutationen in der DNA-Bindedomäne besitzen eine verringerte Affinität zur DNA und konnten somit nicht für Analysen zu den Konsequenzen einer hoch-affinen GAS-Bindung auf die Genexpression eingesetzt werden. Durch Austausch zweier negativ geladener Aminosäurereste in der DNA-Bindedomäne gegen Alanin bzw. Lysin konnten zwei STAT1-Mutanten generiert werden, die im Vergleich mit STAT1-WT eine verstärkte Bindung an DNA zeigen. Überdies konnten wir in dieser Arbeit zwei aminoterminalen Mutanten mit verbesserter kooperativer DNA-Bindung charakterisieren. Durch einzelne Aminosäuresubstitutionen in verschiedenen Domänenbereichen konnten hier erstmalig DNA-Bindemutanten generiert werden, die bei erhaltener GAS-Erkennung isoliert entweder in dimerer oder tetramerer Form besser DNA kontaktieren.

Die Einführung von zwei gezielten Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne resultierte in STAT1-Mutanten mit verbesserter DNA-Bindung bei erhaltener GAS-Stellen-Erkennung. Dazu wurden zwei Glutaminsäurereste in den Positionen 411 und 421 nach Alanin bzw. Arginin mutiert. Von Chen et al. (1998) wurde bereits gezeigt, dass der E421-Rest über Wasserstoffbrücken direkt mit einem Guaninrest der kleinen Furche der DNA in Kontakt steht (**Abb. 3**). Die Annahme, dass ein Austausch von einem negativ geladenen zu einem positiv geladenen Aminosäurerest die elektrostatische Anziehungskraft zu der aufgrund des Phosphatrückgrats negativ geladenen DNA verstärkt, wurde somit bestätigt. Die genaue Berührungsfläche zwischen der DNA und der DNA-Bindedomäne in der näheren Umgebung von E411 ist jedoch nicht bekannt, da in diesem Bereich nichtäquivalente Basenpaare übereinander liegen. Der Aminosäurerest E411 befindet sich in einer Region, die ein dimerspezifisches nukleäres Lokalisationssignal (dsNLS) enthält, welche die Bindung von STAT1-Dimeren an Importin $\alpha 5$ vermittelt (Fagerlund et al., 2002; McBride et al., 2002; Meyer et al., 2002). Dieses Lokalisationssignal wird durch die Substitution von Glutaminsäure nach Alanin bzw. Lysin nicht beeinflusst. Beide Mutanten zeigen eine regelrechte Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation. Die Kristallstrukturdaten von STAT1 zeigen, dass E411 nicht direkt mit der DNA wechselwirkt. In DNA-gebundener Form könnte jedoch ein Kontakt zur DNA-Doppelhelix zustande kommen, vorausgesetzt dass die DNA-Bindedomäne eine geringfügige Flexibilität aufweist. Interessanterweise sind die beiden Glutaminsäurereste nicht an der Unterscheidung zwischen GAS-Stellen und Nicht-GAS-Stellen beteiligt. Der Austausch der Glutaminsäuren zu Alaninen bzw. Lysinen resultiert in STAT1-Mutanten mit erhaltener GAS-Stellen-Erkennung und führt zusätzlich zu einem erweiterten Spektrum an potentiellen Bindungsstellen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp beruht auf der Annahme, dass die Glutaminsäurereste in den Positionen 411 und 421 als eine Art interner Schalter fungieren. Mit ihrer Hilfe kann sich das unmutierte STAT1-Dimer schnell von DNA lösen. Dies geschieht möglicherweise über elektrostatische Abstoßung der Aminosäuren mit der DNA und resultiert in der Freisetzung von STAT1. Erst nach der Dissoziation von DNA können die STAT1-Dimere dann zu einem Substrat der inaktivierenden nukleären Phosphatase werden. Dadurch wird die Anzahl der Moleküle für nukleocytoplasmatisches Shuttling erhöht und ein effektiver Dephosphorylierungs-/Rephosphorylierungskreislauf unterhalten. Die Tatsache, dass die Mutanten an

GAS-Stellen sowie weniger affin auch an Nicht-GAS-Stellen binden, deutet darauf hin, dass der abstoßende Effekt zwischen DNA und den negativ geladenen Seitenketten der DNA-Bindedomäne sowohl an GAS-Stellen sowie an unspezifischen Stellen auftritt. Dies zeigt, dass der abstoßende Effekt sequenzunabhängig ist. Die Charakterisierung der beiden Mutanten E411A/K und E421K offenbart einen simplen molekularen Mechanismus, der es STAT1-Dimeren ermöglicht, sich mit hoher Dissoziationsrate von DNA-Bindungsstellen loszulösen. Damit sind sie wieder bereit, an vorhandene GAS-Stellen zu binden bzw. am nukleocytoplasmatischen Shuttling nach ihrer vorherigen Dephosphorylierung teilzunehmen. Somit konnte durch Dephosphorylierung gezeigt werden, dass eine hohe Dissoziationsrate von DNA ein Schlüsselfaktor für die Zielgenaktivierung ist, sie ermöglicht eine effiziente Übertragung der extrazellulären Signale in transkriptionelle Informationen ohne größeren Verlust an Signalstärke.

Von Meyer et al. (2003) wurden in einer früheren Arbeit zwei STAT1-Mutanten, (DNA^{minus} und DNA^{plus}) charakterisiert, die beide nicht befähigt waren, GAS-Stellen von Nicht-GAS-Bindestellen zu unterscheiden. Sie unterscheiden sich jedoch in der Gesamtaffinität zur DNA. Dabei zeigten in EMSA-Experimenten beide STAT1-Mutanten keine spezifische Interaktion mit DNA. Weiter zeigt die DNA^{minus}-Mutante (V426N; T427N) auch keine Bindung an DNA nach Präzipitation mit Agarose-gebundenen Oligonukleotiden bestehend aus M67-Tandem-Bindestellen bzw. nicht-spezifischer Bindestelle; die DNA^{plus}-Mutante (T327R; V426H; T427H) bindet dagegen sequenzunspezifisch an beide DNA-Fragmente. Beide STAT1-Mutanten zeigen keine transkriptionelle Aktivität im Reporterassay mit 3xLy6E-Bindestellen. Nukleäre Akkumulation ist somit für eine transkriptionelle Aktivität bei Verlust der Diskriminierung zwischen GAS- und Nicht-GAS-Stellen nicht ausreichend. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten fallen in keine dieser Kategorien. Beide werden nach Zytokin-Stimulation in den Zellkern transloziert und erkennen darüber hinaus GAS-Stellen in EMSA-Analysen. Dies unterscheidet sie deutlich von STAT1-DNA^{plus} und erlaubt die hier vorgestellten DNA-Bindemutanten als interessante Instrumente zum Studium der molekularen Mechanismen bei der Zielgenaktivierung einzusetzen. Im Wildtyp-Molekül von STAT1 trägt eine hohe Dissoziationsrate von DNA dazu bei, die DNA-Bindung und die Tyrosin-Dephosphorylierung mit der transkriptionellen Aktivität zu verbinden. Die beiden von mir im Detail untersuchten STAT1-Mutanten zeigen eine deutlich verlängerte DNA-Bindung im Vergleich zu STAT1-WT (**Abb. 13**).

Selbst nach 40-minütiger Kompetition mit unmarkierter DNA ist in Gelshift-Assays noch eine Bindung an Sonden-DNA vorhanden, während diese für das unmutierte Molekül schon längst nicht mehr existiert. Nach Inhibition der JAK-Tyrosinkinasen durch Staurosporin-Behandlung wird der vom Wildtyp-Molekül abweichende Phänotyp deutlich. Der Phosphorylierungsgrad und die DNA-Bindung bei beiden Mutanten sind weiterhin trotz Staurosporin-Behandlung deutlich erhöht (**Abb. 5 und 6**). Zusätzlich binden beide Mutanten auch an unspezifische DNA-Bindestellen, jedoch mit deutlich geringerer Affinität als an hoch-affinen Bindestellen (**Abb. 15**).

Die schnelle Freisetzung von DNA gewährleistet beim Wildtyp-Protein unter den Bedingungen der Zytokinstimulation, dass die intrazelluläre Konzentration von Tyrosinphosphoryliertem STAT1 aufgrund der hohen Tyrosin-Phosphatase-Aktivität im Zellkern immer limitiert ist. In den Punktmutanten E411A/K und E421K ist dieses Zusammenspiel zwischen Loslösung von DNA und schneller Dephosphorylierung gestört, da sie stärker als der Wildtyp an genomischer DNA binden. Dies lässt sich auch in Verbindung mit koexprimiertem nativen STAT1 beobachten (**Abb. 10**). Obwohl die intranukleäre STAT1-Konzentration der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist, wird vermutet, dass die Mutanten einen deutlich geringeren Anteil an ungebundem STAT1 als der Wildtyp aufweisen. Dies ist auf die bereits erwähnte verstärkte Bindung an GAS-Stellen und die zusätzliche unspezifische Bindung an Nicht-GAS-Stellen zurückzuführen. Dadurch befinden sich weniger STAT1-Dimere im nukleocytoplasmatischen Kreislauf als beim Wildtyp-Protein und dies limitiert somit die Zytokin-induzierte Antwort.

Von Meyer et al. (2003) wurde bereits gezeigt, dass DNA-gebundene STAT1-Dimere vor Dephosphorylierung geschützt sind und phosphoryliertes STAT1 den Zellkern nicht verlassen kann. Beide STAT1-Mutanten sind deutlich hyperphosphoryliert, dies deckt sich mit der verlängerten nukleären Akkumulation. Dieses wird als weiterer Beweis dafür gewertet, dass die STAT1-Mutanten an transkriptionell inaktiven Stellen an DNA vermehrt gebunden verbleiben und somit eine geringere Fraktion von STAT1-Molekülen am nukleocytoplasmatischen Shuttling teilnimmt. Dies gilt auch für Heterodimere mit koexprimiertem endogenen STAT1 und erklärt die hier beschriebene Resistenz gegenüber der Digitonin-Behandlung (**Abb.14**).

Obwohl die beiden Punktmutanten E411 und E421 besser an GAS-Stellen binden und eine erhöhte Kernpräsenz zeigen, sind sie erstaunlicherweise deutlich schwächere Transkriptionsaktivatoren als das Wildtyp-Protein. Dies zeigt sich sowohl in

Reporter-gen-Versuchen (**Abb. 18** und **19**) wie auch in *In-vivo*-Real-Time-PCR-Analysen (**Abb. 20**). Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer intakten nukleocytoplasmatischen Translokation für volle transkriptionelle Leistung. Darüber hinaus deutet es darauf hin, dass eine limitierte Kernaufenthaltsdauer eine inhärente Eigenschaft der STAT1-Signaltransduktion ist. Wenn dies nicht gegeben ist, resultiert daraus eine verminderte Genaktivierung. Von Yang et al. (2002) wurde eine STAT1-Mutante in der Linkerdomäne beschrieben, deren Off-Rate von DNA so hoch war, dass sie zu keiner Genaktivierung führte. Daher wird eine bestimmte, limitierende Präsenzdauer am Promotor für die Initiierung transkriptioneller Ereignisse, wie beispielsweise die Rekrutierung von Koaktivatoren, vermutet. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich eine geringere Dissoziationsrate von DNA verglichen mit dem Wildtyp nicht positiv auf die Genaktivierung auswirkt. Die von Yang und Kollegen vorgestellte Mutante in der Linkerdomäne zeigte eine Retention von ca. 1 Min auf DNA, STAT1-WT von ca. 40 Min. und die hier generierten Mutanten sogar eine Retention von über 60 Minuten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zytokin-Stimulation zu einer hohen intranukleären Konzentration der STAT1-Mutanten führt, die deutlich länger als beim Wildtyp persistiert (**Abb. 16**).

Da eine limitierte Anzahl von hoch-affinen GAS-Stellen mit unzähligen niedrig-affinen genomischen DNA-Bereichen um die Bindung für STAT1 konkurriert, ist eine begünstigte Bindung außerhalb von transkriptionell aktiven Stellen für die Höhe der Genaktivierung wohl nachteilig. Interessanterweise konnte eine abgestufte Serie von STAT1-Varianten durch Substitution einer negativen gegen eine neutrale bzw. positive Gruppe an Position 411 (Glutaminsäure > Alanin > Lysin) mit verminderter transkriptioneller Aktivität eines Luciferasereporters bestimmt werden (**Abb. 18**). Dies zeigt, dass ein Austausch der elektrischen Ladungspolarität an dieser Seitenkette die Menge an freien STAT1-Dimeren und damit die Geninduktion beeinflusst. Im ungebundenen, dephosphorylierten Zustand können die Dimere frei zwischen Cytoplasma und Zellkern transloziert werden. Diese graduelle Abstufung transkriptioneller Aktivität ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Glutaminsäurereste als interner Off-Schalter zur Freisetzung von DNA fungieren. Die negativ geladenen Seitenketten zeigen die größte Abstoßung von DNA, und die repulsiven Effekte werden mit der Abnahme der Elektronegativität in diesem Bereich vermindert. Durch Einfügung einer

positiv geladenen Seitenkette wird die Abstoßung mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA weitgehend verhindert.

Die Anwesenheit eines hyperphysiologischen, nukleären Exportsignals (NES) in einer artifiziellen Exportmutante führt zu einem schnellen Kernexport von STAT1. Obwohl die Bindung an DNA mit dem hyperaktiven Kernexport konkurriert, kann trotz IFN γ -Stimulation keine Kernretention von STAT1-NES-GFP induziert werden. Dennoch bewirkt eine Stimulation mit IFN γ eine deutliche Genaktivierung trotz fehlender nukleärer Retention von STAT1. Die Inhibition des NES durch Leptomycin B rekonstituiert in IFN γ -stimulierten Zellen einen kernakkumulierten Zustand und resultiert in transkriptioneller Aktivierung von endogenen Zielgenen. Schon die alleinige Behandlung mit Leptomycin B führt ebenfalls zu einer, wenn auch geringen, Genaktivierung. Die Versuche mit der hyperaktiven Exportmutante STAT1-NES-GFP zeigen ganz klar, dass eine kurze nukleäre Präsenz für die Zielgenfindung ausreicht, wenn eine Erkennung von GAS-Stellen gegeben ist. Minimale Mengen an phosphoryliertem STAT1 reichen aus, um eine transkriptionelle Aktivierung auch ohne Kernakkumulation auszulösen. Daraus kann man schließen, dass die weit überwiegende Mehrheit der nukleären phosphorylierten STAT1-Moleküle an unspezifischen DNA-Sequenzen außerhalb von transkriptionell aktiven Promotorregionen gebunden ist. Die Mutation E411A führt auch in Verbindung mit NES zu einer starken Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität (**Abb. 24**). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Dissoziation von DNA essentiell für die effektive Kopplung von nukleocytoplasmatischem Shuttling mit der Zielgenaktivierung ist.

Die vorherigen Experimente können jedoch nicht klären, ob die supprimierte transkriptionelle Aktivität der DNA-Bindemutanten an nativen Zielgenen von einer verminderten Austauschrate an einzelnen Promotoren oder von einer verringerten Besetzung der GAS-Stellen aufgrund vermehrter Bindung an unspezifischen Bindestellen verursacht wird. Mittels ChIP konnte für die STAT1-E411A-Mutante aber gezeigt werden, dass eine Bindung an native Promotoren vorhanden ist (**Abb. 21**). Wie stark sich parallel stattfindende unspezifische Bindungen auf die Genaktivierung negativ auswirken, konnte nicht ermittelt werden. Shang et al. (2000) konnten allerdings für den Östrogen-Rezeptor demonstrieren, dass individuelle Transkriptionskomplexe mit hohen Austauschraten an multimeren artifiziellen Bindestellen binden. Dies könnte einen Mechanismus darstellen, um kontinuierlich die Menge aktiver Rezeptoren zu messen und in eine transkriptionelle Antwort zu übersetzen. Lerner et al. (2003) be-

schrieben, dass die Bindung von STAT3 und dem Glucocorticoid-Rezeptor alle 15-30 Min. am Promotor erneuert werden muss, um vollständige transkriptionelle Aktivität zu erreichen. Dies deutet darauf hin, dass die verlängerte Bindung an GAS-Stellen oder die verbesserte Kontaktierung von nicht-optimalen GAS-Stellen durch die STAT1-Mutanten einen negativen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung besitzt. Kleinere Unterschiede in der Bindungsaffinität an unspezifische Bindungsstellen bei erhaltener Diskriminierung von GAS und non-GAS-Stellen können möglicherweise erhebliche transkriptionelle Konsequenzen haben.

Ein weiterer Unterschied der beiden DNA-Bindemutanten E411 und E421 gegenüber dem Wildtyp-Molekül ist deren Hyperphosphorylierung. Mögliche Mechanismen für Hyperphosphorylierung von STAT1 könnten auf einem verminderten nukleären Import nach Mutation im Dimer-spezifischen nukleären Importsignal oder anderer Regionen des Proteins, die mit Importin- α wechselwirken, beruhen. STAT1-Mutanten mit beeinträchtigtem nukleären Import sind aufgrund ihrer erhöhten cytosolischen Präsenz ein besseres Substrat der Kinase und im Cytoplasma einer geringen Phosphatase-Aktivität ausgesetzt. Von Meyer et al. (2003) wurde durch *In-vitro*-Versuche gezeigt, dass Tyrosin-phosphorylierte Dimere von aufgereinigtem STAT1 vor Inaktivierung durch nukleäre Phosphatasen aufgrund der DNA-Bindung geschützt sind. Dadurch erfolgt die Retention von phosphoryliertem STAT1 im Zellkern. Die physiologische Bedeutung dieses Ergebnisses konnte bis heute nicht geklärt werden. Es wird vermutet, dass eine verminderte Off-Rate von genomischer DNA die Funktion der STAT-Proteine als wirksame Transkriptionsfaktoren an bestimmten Zielgenen stark beeinträchtigt. Unsere Erfahrungen mit den vorgestellten DNA-Bindemutanten unterstützen diese Hypothese.

Der Schutz vor Dephosphorylierung im DNA-gebundenen Zustand kann den Phänotyp der hier generierten Mutanten erklären. Unsere *In-vitro*-Dephosphorylierungsversuche mit den DNA-Bindemutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp-Molekül eine verringerte Kinetik. Da in den Gesamtzellextrakten DNA-gebundenes und somit vor Dephosphorylierung geschütztes STAT1 vorhanden sein kann, wurde zusätzlich eine Behandlung mit DNase I durchgeführt. Dies änderte jedoch nicht das Ergebnis einer supprimierten Dephosphorylierung der beiden Mutanten (**Abb. 8**). Um weiter auszuschließen, dass sich die verminderte Dephosphorylierungskinetik der Mutanten alleine durch den durch DNA-Bindung vermittelten Schutz vor Inaktivierung ergibt, wurde eine *In-vitro*-Dephosphorylierung mit cytosolischen Extrakten in Gegenwart der TC-

PTP durchgeführt. Dort zeigt sich eine leichte Abnahme der Dephosphorylierung, die ist jedoch immer noch deutlich geringer im Vergleich zu STAT1-WT (**Abb. 9**).

Nach Mertens et al. (2006) ist eine radikale Umorientierung des Tyrosin-phosphorylierten STAT1-Dimers von der parallelen in die antiparallele Form für die Dephosphorylierung nötig. An DNA-gebunden haben die STAT1-Dimere reziproke Wechselwirkungen zwischen dem Phospho-Tyrosinrest des einen und der SH2-Domäne des anderen Monomers. Nach aminoterminaler Dimerisierung kommt es zu einer Rotation der beiden STAT1-Monomere im Dimer und dies führt zu einer Interaktion zwischen dem 4-Helix-Bündel und der DNA-Bindedomäne. Dabei wechselwirkt der F172-Rest der Coiled-coil-Domäne mit einer Tasche in der DNA-Bindedomäne, bestehend aus Q340, G384 und Q408 (Mertens et al., 2006). Daraus resultiert eine Stabilisierung der antiparallelen Struktur und erst dann kann die Phosphatase angreifen (**Abb. 2**). Die beiden Aminosäuren E411 und E421 befinden sich nicht in der beschriebenen Tasche der DNA-Bindedomäne, trotzdem kann eine Beeinflussung des Umlagerungs-Mechanismus durch die beiden Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Es kann sein, dass eine Reorientierung der beiden Monomere von der parallelen zur antiparallelen Struktur im STAT1-Dimer durch die Mutationen erschwert wird. Somit sind die Tyrosin-phosphorylierten Dimere ein schlechteres Substrat der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase. Die mutierten STAT1-Moleküle können also nicht dephosphoryliert werden und daraus resultiert ihre Hyperphosphorylierung, wie in eigenen Experimenten mit nukleären Extrakten nachgewiesen wurde (**Abb. 12**). Des Weiteren zeigt sich bei STAT1-E411A schon nach Stimulation mit niedrigen IFN γ -Konzentrationen eine deutliche Hyperphosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 8**). Um einen Effekt durch DNA-gebundenes STAT1 vollständig ausschließen zu können, sollten die *In-vitro*-Dephosphorylierungsversuche mit aufgereinigtem STAT1-E411A/K und STAT1-E421K wiederholt werden.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Studie gezeigt, dass durch zwei Glutaminsäurereste in der DNA-Bindedomäne, welche die DNA kontaktieren, die Bindung an DNA sequenzunabhängig geschwächt wird. Dies gewährleistet eine effektive Kopplung des nukleocytoplasmatischen Shuttlings mit einer maximalen transkriptionellen Aktivierung. Die hohe Off-Rate von Nicht-GAS-Stellen stellt sicher, dass genügend STAT1-Dimere im Zellkern ungebunden vorliegen und somit vorhandene GAS-Stellen erkennen können. Dort assoziieren sie mit anderen Koaktivatoren in einem transkriptionell aktiven Komplex und translozieren nach Dephosphorylierung

wieder in das Cytoplasma. Unsere Mutanten bestätigen eindrucksvoll, dass nicht nur die hohe Affinität zu GAS-Stellen alleine, sondern die Off-Rate von DNA die Funktion der STAT-Proteine als transkriptionelle Regulatoren entscheidend mit beeinflusst. Bisher sind keine anderen STAT1-Mutanten beschrieben worden, die eine verbesserte DNA-Bindung an GAS-Stellen zeigen und mittels Gelshiftassays nachgewiesen werden können. Diese Eigenschaft kann weiterführend auch für die pharmakologische Wirkstoffforschung eingesetzt werden.

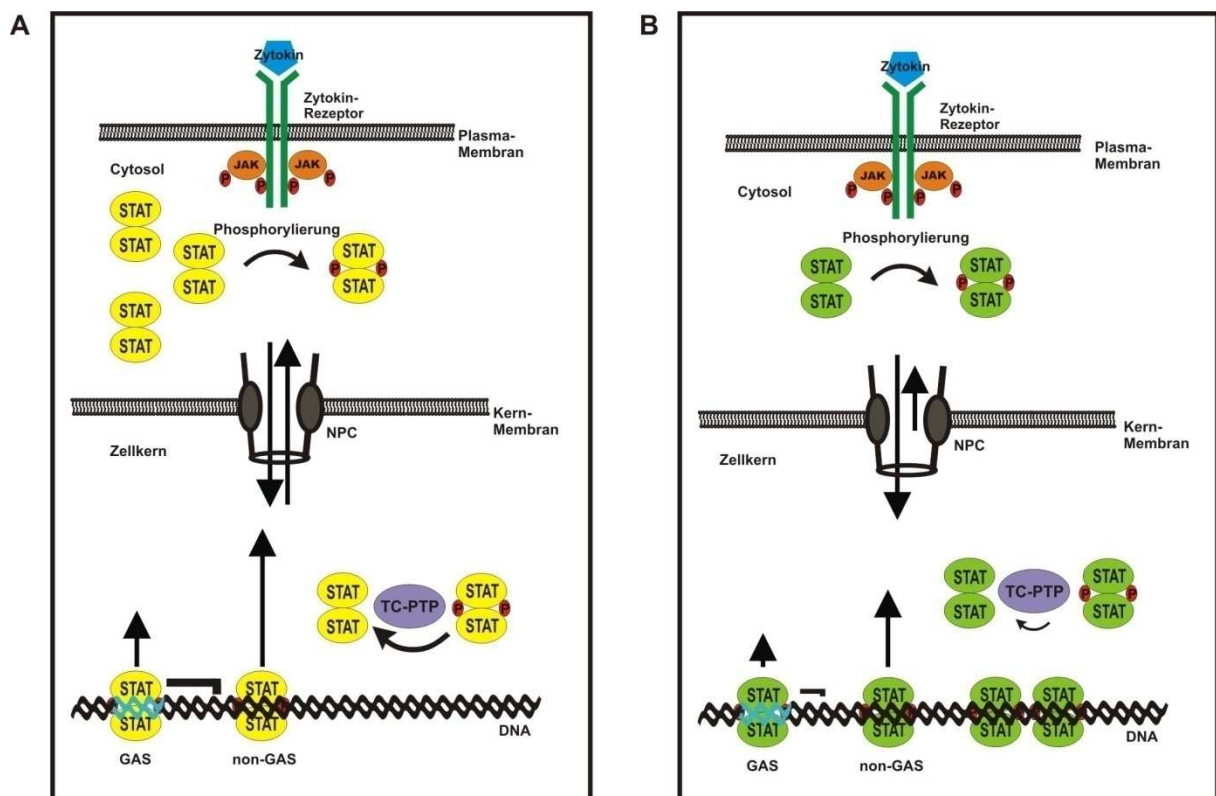


Abb. 42: Schematische Modelle des nukleocytoplasmatischen Shuttlings von STAT1-WT (A) und der beiden DNA-Bindemutanten STAT1-E411A/K bzw. STAT1-E421K (B).

Die Modelle erläutern den Mechanismus der Zytokin-abhängigen Kernakkumulation und veranschaulichen den Unterschied zwischen STAT1-WT und STAT1-E411A/K bzw. STAT1-E421K bezüglich ihrer Dissoziation von DNA sowie nukleären und cytoplasmatischen Verteilung. Die Tyrosin-Phosphorylierung ist in rot dargestellt, die Länge der Pfeile im Kernkompartiment markieren die unterschiedlichen Off-Raten zwischen STAT1 und einer GAS-Stelle (GAS) bzw. einer Nicht-GAS-Stelle (non-GAS). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Dephosphorylierung durch TC-PTP ist durch eine unterschiedliche Länge der Reaktionspfeile gekennzeichnet. Tyrosin-Phosphorylierung bewirkt den nukleären Import des aktivierten STAT1, nach Bindung an DNA kommt es zur Dephosphorylierung der Dimere, gefolgt vom nukleären Export des unphosphorylierten Proteins. Durch die Bindung an DNA wird das Dimer vor Dephosphorylierung geschützt. In (B) ist die vermehrte und verlängerte DNA-Bindung auch an Nicht-GAS-Stellen sowie die geringere Dephosphorylierungsrate und vermehrte Präsenz im Zellkern aufgezeigt.

Es ist schon länger bekannt, dass die Stabilisierung der kooperativen Bindung von STAT-Dimeren auf Tandem-Bindestellen von DNA über die N-Domänen vermittelt

wird (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996). N-terminal trunkiertes STAT1 ist nicht mehr fähig, Tetramere auf DNA zu bilden. Die kooperative Bindung an Tandemstellen ist, im Gegensatz zur Bindung an einfachen GAS-Stellen, stabiler und ermöglicht Variationen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Konsensussequenz zu erkennen. Viele natürliche, „schwache“ Promotoren bestehen aus Tandem-Bindestellen, daher hat die kooperative DNA-Bindung eine physiologische Bedeutung. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass mutiertes STAT5, welches zur Dimer- aber nicht zur Tetramerbildung fähig ist, nur einen Teil seiner Zielgene aktivieren kann. Für eine funktionelle Aktivität an einem größeren Angebot an potentiellen Bindestellen ist die über N-Domänen vermittelte Oligomerisierung essentiell (John et al., 1999). Dabei wird die stabile Tetramerbildung über Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt, in denen ein in allen STATs konservierter Tryptophan-Rest an Stelle 37 und ein Lysin in Position 70 in der aminoterminalen Domäne von STAT5 eine wichtige Rolle spielen. Von Vinkemeier et al. (1998) und Chen et al. (2003) wurden anhand der Kristallstruktur der N-Domäne von STAT4 zwei mögliche Kontaktflächen für aminoterminal-aminoterminal Wechselwirkungen gezeigt. Meyer et al. (2004) konnten durch Mutation eines Phenylalanin in Position 77 von STAT1 eine Mutante generieren, die einen Tetramerisierungsdefekt aufweist. Dieses Ergebnis stützt die Theorie von Chen et al., die den Phenylalaninrest in Position 77 des STAT1-Moleküls als Teil der Kontaktierungsfläche des über aminoterminal Wechselwirkungen stabilisierten Dimers postuliert. Die Beeinflussung der Genaktivierung durch die STAT1-F77A-Mutante ist vom Promotor abhängig. An starken, synthetischen Promotoren zeigt sie eine verbesserte, an allen bislang untersuchten natürlichen Promotoren dagegen eine verminderte transkriptionelle Aktivität.

Die Auswirkungen einer fehlenden Tetramerisierung auf die transkriptionelle Aktivierung wurden schon gezeigt, während die einer verbesserten kooperativen DNA-Bindung von STAT1 dagegen bisher nicht untersucht wurden. Um weitere funktionelle Analysen zu ermöglichen, wurden zwei negativ geladene Aminosäuren in der N-Domäne von STAT1, D92 und E96, ausgetauscht. Daraus resultieren, wie in dieser Arbeit demonstriert, zwei STAT1-Mutanten mit einer verbesserten Tetramerisierung auf DNA bei erhaltener GAS-Stellen-Erkennung.

Die verbesserte kooperative DNA-Bindung von STAT1-D92R und STAT1-E96R zeigt sich in EMSA-Experimenten schon bei geringen STAT1-Konzentrationen an einer GAS-nonGAS-Bindestelle (**Abb. 26 und 28**). Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll,

dass es durch kooperative DNA-Bindung den STAT1-Dimeren ermöglicht wird, auch Variationen in der GAS-Konsensussequenz zu erkennen. Die Dissoziation der Dimeren von einer einfachen artefiziellen GAS-Stelle (M67) wird durch die verbesserte Tetramerisierung nicht beeinflusst, auch bei Konkurrenz verhalten sich die Mutanten wie STAT1-WT. Wie genau die Stabilisierung der Oligomere auf DNA strukturell zu verstehen ist, ist nicht bekannt. Weder D92 noch E96 befinden sich in den von Vinkemeier et al. (1998) und Chen et al. (2002) gezeigten möglichen Kontaktierungsflächen zwischen den N-Domänen. Eine Beteiligung der beiden Aminosäuren an der Rekrutierung von anderen Koaktivatoren kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren zeigt sich in der Fluoreszenzmikroskopie keine Auswirkung der aminoterminalen Mutationen auf die Dauer der Kernakkumulation. In Western-Blot-Analysen mit getrennt aufgetragenen cytoplasmatischen und nukleären Extrakten wird die verlängerte Phosphorylierungsdauer deutlich (**Abb. 34**). Hier zeigen die beiden N-terminalen Mutanten eine Hyperphosphorylierung und eine längere Kernpräsenz als Phosphoproteine verglichen mit STAT1-WT. Das Ergebnis ist insofern bemerkenswert, als dass eine tetramerisierungsdefekte Mutante wie F77A ebenfalls hyperphosphoryliert ist. Im Falle der besser tetramerisierungsfähigen Mutanten ergibt sich dies aus der verbesserten Stabilität von STAT1-Oligomeren auf genomischer DNA im Vergleich zu den dimeren Komplexen. Die DNA-Bindung schützt STAT1 vor Dephosphorylierung, eine stabilisierte und damit verlängerte DNA-Bindung erklärt somit die Hyperphosphorylierung (Meyer et al., 2003). Ergänzend wurden dazu *In-vitro*-Dephosphorylierungsversuche durchgeführt. Dabei lassen sich die STAT1-D92R und -E96R-Mutanten geringfügig, aber signifikant besser dephosphorylieren als der Wildtyp (**Abb. 35**).

Wie schon erwähnt, müssen sich STAT1-Dimere von der parallelen in die antiparallele Struktur umlagern, um ein Substrat der Phosphatase zu werden (Mertens et al., 2006). Dabei sind aminoterminal-aminoterminal Wechselwirkungen beteiligt. Anhand der präferierten kooperativen Bindung auf DNA kann davon ausgegangen werden, dass die über die N-Termini vermittelten Wechselwirkungen zwischen verschiedenen dimeren Komplexen verbessert sind. Es könnte sein, dass bei den aminoterminalen Mutanten D92R und E96R die intermolekularen Interaktionen zwischen den N-Domänen, welche für die Umlagerung benötigt werden, begünstigt werden. Da die genauen Kontaktierungsflächen der Domänen nicht bekannt sind, kann dies aber nicht endgültig geklärt werden. Diese Annahme wird durch den Befund un-

terstützt, dass sich die tetramerisierungsdefiziente F77A-Mutante *in vitro* nicht dephosphorylieren lässt. Es kann im Umkehrschluss angenommen werden, dass bei dieser Mutante der Kontakt der Aminotermini, welcher für die Umlagerung von der parallelen in die antiparallele Struktur notwendig ist, gestört ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Kontaktflächen der N-Domänen, welche im Tetramer miteinander wechselwirken, zusätzlich an der Umstrukturierung der Anordnung der Monomere im Dimer beteiligt sind.

Im Reporter-genassay sind beide aminoterminalen Mutanten an einem synthetischen Promotor mit dreifacher GAS-Stelle bessere Transkriptionsaktivatoren als der Wildtyp (**Abb. 37**). Im Versuch mit nativen Promotorfragmenten mit singulärer GAS-Stelle ist die D92R-Mutante ein besserer Transkriptionsaktivator als der Wildtyp, E96R ist dagegen gleichwertig oder sogar schlechter (**Abb. 38**). *In vivo* zeigen sich in Real-Time-RT-PCR-Versuchen ebenfalls promotorabhängige Effekte auf die Zielgenaktivierung. An den Promotoren für *irf1* und *gbp1* sind D92R und E96R verglichen mit STAT1-WT gleich starke oder schwächere Aktivatoren der Transkription. Am Promotor für *mig1* zeigt sich dagegen eine bessere Zielgenaktivierung (**Abb. 39**). Der Promotor für *mig1* besteht aus zwei schwachen STAT1-Bindestellen im Abstand von 25 bp. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine favorisierte kooperative DNA-Bindung an Tandemstellen in einer erhöhten transkriptionellen Aktivität resultiert. Auf Zielgene mit einfacher GAS-Stelle im Promotor hat die verbesserte Oligomerisierung dagegen keinen Einfluss. Dieser Befund erweitert die bisher bekannte Beobachtung, dass sich eine mangelhafte Tetramerisierung promotorabhängig in einer fehlenden Zielgenaktivierung auswirkt. Anhand der F77A-Mutanten konnte von Meyer et al. (2004) demonstriert werden, dass diese tetramerisierungsdefiziente Mutante im Reporter-genassay mit dreifacher GAS-Bindestelle ein besserer Aktivator der Transkription ist, an natürlichen Promotoren dagegen keine transkriptionelle Aktivität zeigt. Der Effekt einer verbesserten kooperativen DNA-Bindung auf die Zielgenaktivierung ist demnach stark von den jeweiligen Promotoren und deren direktem Umfeld abhängig.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig zwei STAT1-Mutanten generiert, die eine verbesserte Oligomerisierung auf DNA bei erhaltener GAS-Stellen-Erkennung zeigen. Dies wirkt sich bezüglich der transkriptionellen Aktivität an Mehrfach-Bindestellen positiv aus. Weiterführend kann anhand dieser Mutanten untersucht werden, welchem Mechanismus die Stabilisierung der Tetramere auf DNA zu Grunde liegt.

Ein weiterer bekannter Signalweg mit großer Ähnlichkeit zu den hier untersuchten STAT-Proteinen läuft über Mitglieder der Familie des transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF β). Über ihn werden unter anderem Prozesse der Zellproliferation sowie der Zelldifferenzierung gesteuert und Störungen in diesem System wirken sich in vielfältigen Erkrankungen, unter anderem Tumoren und Lungenfibrose, aus. Als Mediatoren fungieren in diesem Signaltransduktionsweg SMAD-Proteine, welche als Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (Heldin et al., 1997). Der Signaltransduktionsweg der Rezeptor-regulierten SMADs ist dem von STAT1 bemerkenswert ähnlich. Nach Phosphorylierung durch den TGF β -Rezeptor kommt es zu einer Homo-Oligomerisierung von SMAD2 und -3 sowie einer Hetero-Oligomerisierung mit SMAD4, einer nachfolgenden Translokation in den Zellkern und der transkriptionellen Aktivierung von TGF β -responsiven Genen. Bei den SMADs ist, ähnlich wie bei STAT1, die Phosphorylierung mit der Dephosphorylierung durch nukleocytoplasmatische Translokation gekoppelt. Durch dieses dynamische Netzwerk können quantitative Merkmale des extrazellulären Signals, wie Dauer und Intensität der Signalweiterleitung, erfasst werden (Schmierer et al., 2008). Von Stroschein et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass SMAD4 und -3 an zwei benachbarten DNA-Elementen eine kooperative Bindung eingehen, die für die Aktivierung des Zielgens Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1 (PAI-1) essentiell ist. Dabei wird die Transaktivierung über aminoterminal SMAD-Domänen vermittelt. Durch die Oligomerisierung von SMAD3 kommt es, wie auch bei den STATs beobachtet, zu einer deutlichen Verstärkung der DNA-Bindung. Vasilaki et al. (2009) konnten zwei konservierte Aminosäuren in der Linkerdomäne identifizieren, die eine wichtige Rolle bei der Homo- und Hetero-Oligomerisierung, der Kernakkumulation sowie der DNA-Bindung spielen. Aufgrund der beachtlichen Analogien im mechanistischen Design der Signalwege von STATs und SMADs sollten neu gewonnene Informationen und Funktionsmechanismen auf den jeweils anderen Signalweg experimentell überprüft werden. In beiden Fällen sind die Mechanismen zur Zielgenerkennung und -aktivierung noch nicht vollständig aufgeklärt und man kann sich Synergien aus einer gemeinschaftlichen Betrachtung beider Signalwege erhoffen.

Im klinischen Teil der Studie wurde untersucht, ob in humanen Proben von Patienten mit einerseits einer immunologisch vermittelten Erkrankung, wie der dilatativen Kardiomyopathie, und andererseits proliferativen Erkrankungen, wie Leukämien, pathogenetisch bedeutsame Polymorphismen oder Mutationen des STAT1-Gens

auftreten. Ein solcher Ansatz erscheint gerechtfertigt, da der JAK-STAT-Signalweg auf Entstehung und Entwicklung von Herzerkrankungen und Tumoren einen Einfluss hat. Bisher wurden jedoch noch keine Polymorphismen des STAT1-Gens mit diesen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht.

Für die Analysen wurden DNA-Proben von 235 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sowie von neun Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie bzw. von elf Patienten mit akuter myeloischer Leukämie untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass keine relevanten Mutationen im STAT1-Gen in den untersuchten Exon-Bereichen vorliegen. Weitere Untersuchungen in unserem Labor im Exon 4 der DCM-Patientenproben konnten ebenfalls keine Mutationen aufdecken. Bisher wurden vermehrt Expressionsänderungen von STAT3 und STAT5 mit den hier untersuchten Erkrankungen in Verbindung gebracht, daher ist das hier vorliegende Ergebnis nicht unerwartet.

Infektionen von Patienten können ihren Ursprung auch in einem Immundefekt haben, welcher durch Störungen der Signalwege der angeborenen Immunität hervorgerufen wird. Dies kann sich in einer spezifischen Anfälligkeit gegen bestimmte Erregergruppen oder eines Erregers auswirken. Ein Beispiel dafür ist eine besondere Anfälligkeit gegen Mykobakterien, welche ein Hinweis auf Defekte im IFN γ -Signalweg sein kann. Dupuis et al. (2001) konnten zeigen, dass bei bisher zehn Patienten mit Mendel'scher Suszeptibilität für eine mykobakterielle Infektion (MSMD) STAT1-Mutationen vorlagen. Zelllinien aus Patienten mit homozygoten, autosomal-rezessiven Mutationen können durch Vesikulostomatitis (VSV), Enzephalomyokarditis (EMCV) und Herpes-Simplex-Viren (HSV-1) hervorgerufene Infektionen nicht kontrollieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patienten mit komplettem STAT1-Defekt zusätzlich zur MSMD für schwere virale Infektionen hoch anfällig sind, was in einigen Fällen schon zum Tod geführt hat (Dupuis et al., 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass weitere Untersuchungen in diesen oder anderen Krankheitsbildern mit größeren Stichprobenumfängen durchgeführt werden sollten.

7 Literatur

Akira, S. (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* **17**, 138-146.

Aronica, M.G., Brizzi, M.F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y., Pegoraro, L. (1996) p91 STAT1 activation in interleukin-3-stimulated primary acute myeloid leukemia cells. *Oncogene* **13**, 1017-1026.

Barillas-Mury, C., Han, Y.-S., Seeley, D., Kafatos, F.C. (1999) Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J* **18**, 959-967.

Becker, S., Groner, B., Müller, C. W. (1998) Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature* **394**, 145-151.

Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2000) Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10418-10423.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-365.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* **15**, 749-795.

Boudný, V., Kocák, I., Lauerová, L., Kovarík, J. (2003) Interferon inducibility of STAT 1 activation and its prognostic significance in melanoma patients. *Folia Biol (Praha)* **49**, 142-146.

Boudný V, Dusek L, Adámková L, Chumchalová J, Kocák I, Fait V, Lauerová L, Krejčí E, Kovarík J. (2005) Lack of STAT 1 phosphorylation at TYR 701 by IFN γ correlates with disease outcome in melanoma patients. *Neoplasma* **52**, 330-337

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2488.

Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Wen, Z., Schreiber, R. D., Darnell, J. E., Jr. (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7673-7678.

Bromberg, J.F., Fan, Z., Brown, C., Mendelsohn, J., Darnell J.E. Jr. (1998) Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ* **9**, 505-512

Chang, C.-H., Hammer, J., Loh, J.E., Fodor, W.L., Flavell, R.A. (1992) The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* **35**, 378-384.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., Stark, G. R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* **19**, 4111-4122.

Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E. Jr., Kuriyan J. (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* **93**, 827-839.

Chen, X., Bhandari, R., Vinkemeier, W., van den Akker, F., Darnell, J.E. Jr., Kuriyan, J. (2003) A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal Domains of STATs. *Protein Science* **12**, 361-365.

Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., Fu, X.Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1:CIP1 mediated by STAT1. *Science* **272**, 719-722.

- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A., Fu, X.Y. (1997) Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**, 5328-5337.
- Chretien, S., Varlet, P., Verdier, F., Gobert, S., Cartron, J.P., Gisselbrecht, S. (1996) Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation. *EMBO J* **15**, 4174-4181.
- Cirino, N. M., Li, G. Y., Xiao, W., Torrence, P. F., Silverman, R. H. (1997) Targeting RNA decay with 2',5' oligoadenylate-antisense in respiratory syncytial virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1937-1942.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E. Jr., Mui, A.L., Miyajima, A., Quelle, F.W., Ihle, J.I., Jenkins, N.A. (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* **29**, 225-228.
- Darnell, J.E.J., Kerr, I.M., Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.
- Darnell, J.E. Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635.
- Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **17**, 121-134.
- Decker, T., Kovarik, P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-15628.

- Diaz-Guerra, M., Rivas, C., Esteban, M. (1997) Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* **227**, 220-228.
- Dupuis, S., Dargemont, C., Fieschi, C., Thomassin, N., Rosenzweig, S., Harris, J., Holland, S.M., Schreiber, R.D., Casanova, J.L. (2001) Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* **293**, 300-303.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al-Ghonaïm, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R.D., Gresser, I., Casanova, J.L. (2003) Impaired response to interferon- α/β and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* **33**, 388-391.
- Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H., Lottspeich, F. (1988) A new siliconized-glass fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. *Eur J Biochem* **176**, 509-519.
- Ehret, G.B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C.M., Fritz, S., Nabholz, M., Bucher, P. (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of *in vitro* specificity with natural target sites. *J Biol Chem* **276**, 6675-6688.
- Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L., Julkunen, I. (2002) Arginine/Lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin $\alpha 5$. *J Biol Chem* **277**, 30072-30078.
- Frese, M., Kochs, G., Feldmann, H., Hertkorn, C., Haller, O. (1996) Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol* **70**, 915-923.
- Friedmann, M.C., Migone, T.S., Russell, S.M., Leonard, W.J. (1996) Different interleukin 2 receptor β -chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2077-2082.

- Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., Koyasu, S. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* **22**, 556-560.
- Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner B., Ihle, J. N., Minami, Y., Miyazaki, T. (1995) Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor β chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc Natl Acad Sci U SA* **92**, 5482-5486.
- Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Hirano, T. (1996) Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* **5**, 449-460.
- Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Osugi, T., Hirota, H., Izumi, M., Yoshizaki, K., Walsh, K., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. (2000) Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **275**, 10561-10566.
- Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C. (1996) STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* **87**, 1692-1697.
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J., Schreiber, R.D. (1995) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* **2**, 677-687.
- Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J., Schindler, C. (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. *EMBO J* **15**, 1075-1084.

Haspel, R.L., Salditt-Georgieff, M., Darnell, J.E. Jr. (1996) The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* **15**, 6262-6268.

Haspel, R.L., Darnell, J.E. Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10188-10193.

Hattori, R., Maulik, N., Otani, H., Zhu, L., Cordis, G., Engelman, R.M., Siddiqui, M.A., Das, D.K. (2001) Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1929-1936.

Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R., Darnell, J.E. Jr. (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* **267**, 1347-1349.

Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471.

Herrington, J., Rui, L., Luo, G., Yu-Lee, L.Y., Carter-Su, C. (1999) A functional DNA binding domain is required for growth hormone-induced nuclear accumulation of Stat5B. *J Biol Chem* **274**, 5138-5145

ten Hoeve, J., de, J., I, Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., Shuai, K. (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **22**, 5662-5668.

Horvath, C. M., Wen, Z., Darnell, J. E. Jr. (1995) A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* **9**, 984-994.

Horvath, C.M. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* **25**, 496-502.

Hou, J., Baichwal, V., Cao, Z. (1994) Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11641-11645.

Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R. Soc Lond B* **147**, 258-267.

Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E. Jr., Murphy, K.M. (1995) Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* **181**, 1755-1762.

John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J.E. Jr., Leonard, W.J. (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol* **19**, 1910–1918.

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7556-7561.

Kawata. T., Shevchenko, A., Fukuzawa, M., Jermyn, K.A., Totty, N.F., Zhukovskaya, N.V., Sterling, A.E., Mann, M., Williams, J.G. (1997) SH2 Signaling in a lower eukaryote: A STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell* **89**, 909-916.

Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.

Köster, M., Hauser, H. (1999). Dynamic redistribution of STAT1 protein in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins. *Eur J Biochem* **260**, 137-144.

- Kovarik, P., Stoiber, D., Novy, M., Decker, T. (1998). Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J.* **17**, 3660-3668.
- Kovarik, J., Boudny, V., Kocak, I., Lauerova, L., Fait, V., Vagundova, M. (2003) Malignant melanoma associates with deficient IFN-induced STAT 1 phosphorylation. *Int J Mol Med* **12**, 335-340.
- Krämer, O.H., Knauer, S.K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K.H., Stauber, R.H., Böhmer, F.D., Heinzel, T. (2009) A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* **2**, 223-235.
- Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T.W., Horvath, C.M., Stark, G.R. (1997) Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* **278**, 1630-1632.
- Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y. (1998) Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 346–352.
- Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Yamada, S., Okabe, M., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. (2000) Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 315-319.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langer, J.A., Pestka, S. (1988) Interferon receptors. *Immunol Today* **9**, 393-400.
- Lee, C.-K., Smith, E., Gimeno, R., Gertner, R., Levy, D.E. (2000a) STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN- γ . *J Immunol* **164**, 1286-1292.

Lee, C.K., Rao, D.T., Gertner, R., Gimeno, R., Frey, A.B., Levy, D.E. (2000b) Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* **165**, 3571-3577.

Lerner, L., Hendriksen, M.A., Zhang, X., Darnell, J.E. Jr. (2003) STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* **17**, 2564-2577.

Leung, S., Li, X., Stark, G.R. (1996) STATs find that hanging together can be stimulating. *Science* **273**, 750-751.

Levy, D.E., Darnell, J.E. Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651-662.

Liao, J., Fu, Y., Shuai, K. (2000) Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5267-5272.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10626-10631.

Liu, X., Quinn, A.M., Chin, Y.E., Fu, X.-Y., Ruvkun, G., Hobert, O. (1999) STAT genes found in *C. elegans*. *Science* **285**, 167.

Look, D.C., Pelletier, M.R., Tidwell, R.M., Roswit, W.T., Holtzman, M.J. (1995) Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J Biol Chem* **51**, 30264-30267.

Ma, J., Cao, J. (2006) Regulation of Stat3 nuclear import by importin α 5 and importin α 7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal* **18**, 1117-1126.

Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., Reith, W. (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* **14**, 301-331.

MacMicking, J., Xie, Q.-W., Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**, 323-350.

Mao, X., Ren, Z., Parker, G.N., Sonderrmann, H., Pastorello, M.A., Wang, W., McMurray, J.S., Demeler, B., Darnell, J.E. Jr., Chen, X. (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* **17**, 761-771.

Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., Vinkemeier, U. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* **165**, 823-833.

Marg, A., Meyer, T., Vigneron, M., Vinkemeier, U. (2008) Microinjected antibodies interfere with protein nucleocytoplasmic shuttling by distinct molecular mechanisms. *Cytometry A* **73A**, 1128-1140.

Mascareno, E., Dhar, M., Siddiqui, M.A. (1998) Signal transduction and activator of transcription (STAT) protein-dependent activation of angiotensinogen promoter: a cellular signal for hypertrophy in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5590-5594.

McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N. C. (2002) Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *EMBO J* **21**, 1754-1763.

Meissner, T., Krause, E., Lödige, I., Vinkemeier, U. (2004) Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* **119**, 587-589.

Melén K., Kinnunen, L., Julkunen, I. (2001) Arginine/Lysine-rich structural element is involved in Interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* **276**, 16447-16455.

Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., Darnell, J.E. Jr. (2006) Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial

reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* **20**, 3372-3381.

Meurs, E.F., Watanabe, Y., Kadereit, S., Barber, G.N., Katze, M.G., Chong, K., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. (1992) Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J Virol* **66**, 5805-5814.

Meyer, T., Begitt, A., Lödige, I., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2002) Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* **21**, 344-354.

Meyer, T., Marg, A., Lemke, P., Wiesner, B., Vinkemeier, U. (2003) DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* **17**, 1992-2005.

Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S., Vinkemeier, U. (2004) A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J Biol Chem* **279**, 18998-19007.

Mowen, K., David, M. (1998). Role of the STAT1-SH2 domain and STAT2 in the activation and nuclear translocation of STAT1. *J Biol Chem* **273**, 30073-30076.

Möhlethaler-Mottet, A., Di Berardino, W., Otten, L.A., Mach, B. (1998) Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* **8**, 157-166.

Müller, M., Laxton, C., Briscoe, J., Schindler, C., Improta, T., Darnell, J.E. Jr., Stark, G.R., Kerr, I.M. (1993) Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kDa polypeptide of ISGF3 in the interferon-alpha and -gamma signal transduction pathways. *EMBO J* **12**, 4221-4228.

Murphy, T.L., Geissal, E.D., Farrar, J.D., Murphy, K.M. (2000) Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* **20**, 7121-7131.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., Kishimoto, T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929.

Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M.I., Eizirik, D.L., Osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., Hirota, H., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. (2001) Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* **104**, 979-981.

Ng, D.C., Court, N.W., dos Remedios, C.G., Bogoyevitch, M.A. (2003) Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways in failing human hearts. *Cardiovasc Res* **57**, 333-346.

Nicola, N.A. (1994) Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells* **12**, 3-12.

Novick, D., Cohen, B., Rubinstein, M. (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**, 391-400.

Oates, A.C., Wollberg, P., Pratt, S.J., Paw, B.H., Johnson, S.L., Ho, R.K., Postlethwait, J.H., Zon, L.I., Wilks, A.F. (1999) Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line. *Dev Dyn* **215**, 352-370.

Omura, T., Yoshiyama, M., Ishikura, F. (2001) Myocardial ischemia activates the JAK-STAT pathway through angiotensin II signaling in in vivo myocardium of rats. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 307-316.

- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **4**, 874-879.
- O'Shea, J.J. (1997) Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity* **7**, 1-11.
- O'Shea, J.J., Gadina, M., Schreiber, R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109**, 121-131.
- Ota, N., Brett, T.J., Murphy, T.L., Fremont, D.H., Murphy, K.M. (2004) N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. *Nat Immunol* **2**, 208-215.
- Ouchi, T., Lee, S.W., Ouchi, M., Aaronson, S.A., Horvath, C.M. (2000) Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN- γ target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5208-5213.
- Park, C., Li, S., Cha, E., Schindler, C. (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* **13**, 795-804.
- Pascal, A., Riou, J.-F., Carron, C., Boucaut, J.-C., Umbhauer, M. (2001) Cloning and developmental expression of STAT5 in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **106**, 171-174.
- Paulson, M., Pisharody, S., Pan, L., Guadagno, S., Mui, A.L., Levy, D.E. (1999) Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J Biol Chem* **274**, 25343-25349.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Platanias, L.C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat Rev Immunol* **5**, 375-386.

Podewski, E.K., Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Morawietz, H., Lichtenberg, A., Woltert, K.C., Drexler, H. (2003) Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* **107**, 798-802.

Ramana C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D., Stark, G.R. (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol* **23**, 96-101.

Sadowski, H.B., Shuai, K., Darnell, J.E. Jr., Gilman, M.Z. (1993) A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* **261**, 1739-1744.

Sahni, M., Raz, R., Coffin, J.D., Levy, D., Basilico, C. (2001) STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development* **128**, 2119-2129.

Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R., Darnell, J.E. Jr. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257**, 809-813.

Schindler, C. and Darnell, J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* **64**, 621-651.

Schmierer, B., Tournier, A.L., Bates, P.A., Hill, C.S. (2008) Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6608-6613.

Schooltink, H., Rose-John, S. (2002) Cytokines as therapeutic drugs. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 505-516.

Seidel, H.M., Milocco, L.H., Lamb, P., Darnell, J.E. Jr., Stein, R.B., Rosen, J. (1995) Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal trans-

ducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3041-3045.

Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T., Yoneda, Y. (1996) Interferon-gamma- dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem* **271**, 31017-31020.

Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., Yoneda, Y. (1997) Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* **16**, 7067-7077.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**, 843-852.

Shen, Y., Darnell, J.E. Jr. (2001) Antiviral response in cells containing Stat1 with heterologous transactivation domains. *J Virol* **75**, 2627-3263.

Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., Ihle, J.N. (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* **380**, 630-633.

Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., Darnell, J.E. Jr. (1992) Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* **258**, 1808-1812.

Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M., Darnell, J.E. Jr. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science*, **261**, 1744-1746.

Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E. Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* **76**, 821-828.

Shuai, K., Liao, J., Song, M.M. (1996) Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol Cell Biol* **16**, 4932-4941.

Shuai, K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638-2644.

Soler-Lopez, M., Petosa, C., Fukuzawa, M., Ravelli, R., Williams, J.G., Müller, C.W. (2004) Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-unbound form. *Mol Cell* **13**, 791-804.

Song, J.I., Grandis, J.R. (2000) STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* **19**, 2489-2495.

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-264.

Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., Hilton, D.J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-921.

Strehlow, I., Schindler, C. (1998) Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem* **273**, 28049-28056.

Stroschein, S.L., Wang, W., Luo, K. (1999) Cooperative binding of Smad proteins to two adjacent DNA elements in the plasminogen activator inhibitor-1 promoter mediates transforming growth factor beta-induced smad-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* **274**, 9431-9441.

Su, W.C., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W.A., Fu, X.Y. (1997) Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* **386**, 288-292.

Sun, W., Xu, W., Snyder, M., He, W., Ho, H., Ivashkiv, L.B., Zhang, J.J. (2005) The conserved Leu-724 residue is required for both serine phosphorylation and co-activator recruitment for Stat1-mediated transcription activation in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* **280**, 41844-41851.

Sung, S.-C., Fan, T.-J., Chou, C.-M., Leu, J.-H., Hsu, Y.-L., Chen, S.-T., Hsieh, Y.-C., Huang, C.-J. (2003) Genomic structure, expression and characterization of a STAT5 homologue from pufferfish. *Eur J Biochem* **270**, 239-252.

Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T. (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**, 627-630.

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., Akira, S. (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* **161**, 4652-4660.

Thomson, A. (1998) The cytokine handbook 3rd edn *Academic Press*, San Diego.

Townsend, P.A., Scarabelli, T.M., Davidson, S.M., Knight, R.A., Latchman, D.S., Stephanou, A. (2004) STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 5811-5820.

Van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers, J.A., Johnson, J.P., van der Saag, P.T. (1994) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* **269**, 6185-6192.

Vasilaki, E., Siderakis, M., Papakosta, P., Skourti-Stathaki, K., Mavridou, S., Kardassis, D. (2009) Novel regulation of Smad3 oligomerization and DNA binding by its linker domain. *Biochemistry* **48**, 8366-8378.

- Vinkemeier, U., Cohen, S.L., Moarefi, I., Chait, B.T., Kuriyan, J., Darnell, J.E. Jr. (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* **15**, 5616-5626.
- Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J.E.Jr., Kuriyan, J. (1998) Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* **279**, 1048-1052.
- Vinkemeier, U. (2004) Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit. *J Cell Biol* **167**, 197-201.
- Weber, S., Maass, F., Schuemann, M., Krause, E., Suske, G., Bauer, U.M. (2009) PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* **23**, 118-132.
- Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J. (1996) Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein- Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* **88**, 809-816.
- Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J.E. Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, **82**, 241-250.
- Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S., Vinkemeier, U. (2008) Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9238-9243.
- Williams, J.G. (2000) STAT signalling in cell proliferation and development. *Curr Opin Gen Dev* **10**, 503-507.
- Wojciak, J.M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2009) Structural basis for recruitment of CBP/p300 coactivators by STAT1 and STAT2 transactivation domains. *EMBO J* **28**, 948-58.

- Wormald, S., Hilton, D.J., Smyth, G.K., Speed, T.P. (2006) Proximal genomic localization of STAT1 binding and regulated transcriptional activity. *BMC Genomics* **7**, 1-13.
- Xu, X., Sun, Y.L., Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* **273**, 794-797.
- Xuan, Y.T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y., Bolli, R. (2001) An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9050-9055.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C.R., Darnell, J.E. Jr. (1996) Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* **84**, 421-430.
- Yang, E., Wen, Z., Haspel, R. L., Zhang, J.J., Darnell, J.E. Jr. (1999) The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 5106-5112.
- Yang, E., Henriksen, M. A., Schaefer, O., Zakharova, N., Darnell, J.E. Jr. (2002) Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem* **277**, 13455-13462.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C., Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* **267**, 1990-1994.
- Zhang, J.J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C.M., Darnell, J.E. Jr. (1996) Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 15092-15096.
- Zhang, J.J., Zhao, Y., Chait, B.T., Lathem, W.W., Ritzi, M., Knippers, R., Darnell, J.E. Jr. (1998) Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1 α in IFN- γ -induced transcriptional activation. *EMBO J* **17**, 6963-6971.

Zhang, X., Darnell, J.E. Jr. (2001) Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem* **7**, 33576-33581.

Zhao, H., De, B.P., Das, T., Banerjee, A.K. (1996) Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology* **220**, 330-338.

Zhao, W., Cha, E.N., Lee, C., Park, C.Y., Schindler, C. (2007) Stat2-dependent regulation of MHC class II expression. *J Immunol* **179**, 463-471.

Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E. Jr. (1994) Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4806-4810.

Zhu, M., John, S., Berg, M., Leonard, W.J. (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* **96**, 121-130.

Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinski, U., Hengel, H. (2005) A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med* **201**, 1543-1553.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. mult. Thomas Meyer für die Bereitstellung dieses hochinteressanten Themas und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung. Vor allem seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens und für die Anregung von neuen Ideen.

Herrn Prof. Dr. Maisch danke ich für die freundliche Aufnahme in der Kardiologie und die wissenschaftliche Unterstützung.

Julia Polaczek danke ich ganz herzlich für die sehr angenehme Zusammenarbeit, für ihre Unterstützung bei den Gelshift-Versuchen, für die Durchsicht dieser Arbeit und für die vielen akademischen und nicht-akademischen Gespräche. Ohne sie hätte das Arbeiten deutlich weniger Spaß gemacht.

Herrn Dr. Volker Ruppert danke ich ebenfalls für die angenehme Zusammenarbeit und für sämtliche Hilfestellungen in den letzten Jahren.

Miriam Gehring danke ich für die Unterstützung in meiner Anfangszeit und für ihre Mitarbeit an der E411A-Mutante. Ihre fröhliche Art war eine echte Bereicherung für mich.

Marlies Crombach danke ich für die gute Einarbeitung in die Zellkultur und die nette Zusammenarbeit. Frau Sandra Sieber danke ich für die technische Unterstützung in einigen Experimenten.

Den Arbeitsgruppen Herzchirurgie, Neurologie und Orthopädie danke ich für die nette Nachbarschaft, für die Möglichkeit die Laborgeräte mitbenutzen zu können und für die zahllosen Gespräche und Kaffeepausen.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Familie und Freunde, die mich all die Jahre liebevoll unterstützt und motiviert haben. Vor allem danke ich meinem Freund Tobias, der all meine Launen mit Geduld ertragen musste.

Anhang

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

European Conference on Myocardial and Pericardial Disease with additional Focus on Heart Disease in Women, 11. – 14. Oktober 2007 in Marburg: Requirements for promoter recognition of STAT transcription factors in inflammatory heart disease (moderiertes Poster).

American Psychosomatic Society 68th Annual Scientific Meeting, 10. – 14. März 2010 in Portland, USA: Mutational Approach for Studying the Role of STAT1 Transcription Factor in the Pathogenesis of Depression (Poster).

Veröffentlichungen in Bearbeitung:

Koch, V., Ruppert, V., Gehring, M., Maisch, B., Vinkemeier, U., Meyer, T. A high dissociation rate from DNA links tyrosine dephosphorylation of STAT1 transcription factor to gene activation.

Koch, V., Polaczek, J., Maisch, B., Meyer, T. Differential gene activation of STAT1 due to enhanced cooperative DNA binding.